

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET
BRUXELLES

N. KAMIYA
OSAKA

A. PISCHINGER
WIEN

S. STRUGGER
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK
ROSTOCK

FRIEDL WEBER
GRAZ

KARL HÖFLER
WIEN

BAND LII, HEFT 3

MIT 90 TEXTABBILDUNGEN

ABGESCHLOSSEN AM 14. JULI 1960



WIEN

SPRINGER-VERLAG

1960

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint swangios in einsein berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Gras, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Speck, Zoologisches Institut, (2a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich,

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Benutzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenauszug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostensersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

LII. Band

Inhaltsverzeichnis

3. Heft

Abhandlungen

Ariesz, W. H.: Symplasmatischer Salztransport in <i>Vallisneria</i> -Blättern	309
Enöckl, F.: Uranin-Fluorochromierung von <i>Allium</i> -Zellen nach Vorbehandlung mit Ammonkarbonat	344
Linke, W.: Wärmebewegungen beim Koazervationsprozeß	376
Weixl-Hofmann, Hertha: Über bemerkenswerte Entwicklungsformen bei <i>Candida albicans</i> und ihre Färbbarkeit mit Nilblau	385
Pitschmann, H., und F. Scheminzky: Über die Entstehung von Traubescen Ferroferriyanzellen bei der Berlinerblau-Mikroreaktion auf Eisen	409
Nakajima, H.: Some Properties of a Contractile Protein in a Myxomycete <i>Plasmodium</i>	413
Kelbitsch, Helga: <i>Cuscuta</i> als Überträger des Crown-gall-erzeugenden Prinzips	437
Miličić, D., und Zlata Udjinac: Die Eiweißkristalle von <i>Capsicum annuum</i> sind Viruskörper	446

Sammelreferat

Maramorosch, K.: Leafhopper-transmitted Plant Viruses	457
---	-----

Referate

.	467
-----------	-----

Symplasmatischer Salztransport in *Vallisneria*-Blättern

Von

W. H. Arisz

Universität Groningen, Holland

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Februar 1960)

Einleitung

In dieser Mitteilung wird eine Bearbeitung von zwei Vorträgen gegeben, welche ich auf dem Botanischen Kongreß in Montreal 1959 gehalten habe.

Der erste Vortrag „Symplasm theory of salt uptake into and transport in parenchymatic tissue“ war ein Beitrag zum Symposium „The role of protoplasm in uptake and transfer of ions“, worin die rezente Entwicklung der Aufnahmeprobleme von verschiedenen Seiten beleuchtet wurde. Von den sieben übrigen Vorträgen, welche R. N. Robertson, R. Overstreet, J. F. Sutcliffe, E. Epstein, R. J. Helder, P. J. Kramer und J. Dainty gehalten haben, möchte ich hier die zwei ersten etwas ausführlicher erwähnen, da sie für die heutige Auffassung der Aufnahme- prozesse von grundlegender Bedeutung sind.

R. N. Robertson (Sydney, Australien) besprach den Zusammenhang zwischen den Aufnahmeerscheinungen und den neuen Daten über die Zellwandstruktur und den Bau des Protoplasmas, wobei die Lokalisierung der absorbierten Ionen im plasmatischen freien Raum, im Donnan-Raum, im Cytoplasma, in den Protoplasmaorganellen und in den Vakuolen besprochen wurde. Das mit Hilfe des Elektronenmikroskopes studierte Protoplasma zeigt eine große Anzahl membranartiger und granulärer Strukturen, deren Funktion noch nicht klar ist. Die Bewegung der Ionen in das Cytoplasma erfolgt langsam, die nach der Vakuole sehr langsam. Das ist die Folge des verschiedenen Wertes der Diffusionskonstante in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle und hängt mit der Ionenpermeabilität der Membranen zusammen. Die Membranen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums beschränken die Bewegung der Ionen im Cytoplasma. Die Erforschung der Bedeutung dieser Strukturen für die Ionenaufnahme und die Stoffleitung kann besonders wertvoll werden für unser Verständnis der Aufnahmeprozesse.

R. Overstreet (Berkeley, U. S. A.) erläuterte seine neue Strukturtheorie der Salzaufnahme. Selber einer der Urheber der Trägertheorie, betonte er, daß unser

Verständnis der Salzaufnahme sich jetzt in einem verworrenen Zustand befindet. Die in den letzten Jahren erhaltenen quantitativen Daten weisen auf die Kompliziertheit der Absorptionsprozesse. Die einfache Trägertheorie beruht auf der Auffassung, daß die Ionenabsorption ein chemischer Prozeß ist. Die Ionen werden an einen Träger gebunden und formen damit einen Komplex. Sie können infolge der Eigenschaften dieses Komplexes die Plasmamembran passieren. Nach der Passage der Membran sollten die Ionen in einer zweiten chemischen Reaktion aus dem Komplex wieder frei gemacht werden. Es wird meistens angenommen, daß diese Reaktion für die Aufnahme begrenzend wirkt.

Epstein und Hagen haben die Salzaufnahme in die Zelle verglichen mit der Bindung des Substrates an ein Enzym mit darauffolgender irreversibler Spaltung des Komplexes. Das hat die Möglichkeit geöffnet, die Theorie der Enzymkinetik auf die Ionenabsorption anzuwenden, wenn vorausgesetzt wird, daß die Summe der freien und gebundenen Träger konstant ist. Gegen eine unbeschränkte Ausbreitung dieser Betrachtungsweise hat Overstreet Bedenken geäußert. Er ist durch neue Versuche zu der Überzeugung gekommen, daß es keine allgemeingültige Beziehung zwischen Ionenaufnahme und Konzentration der Außenlösung gibt. Er hat gefunden, daß nicht immer eine lineare Beziehung besteht zwischen Aufnahme und Zeit und auch nicht immer eine Langmuir-Kurve die Beziehung zwischen Aufnahme und Konzentration der Außenlösung zum Ausdruck bringt. Man hat nun versucht, dergleichen Fälle durch die Anwesenheit mehrerer Arten von Trägern zu erklären. Es ist aber nicht möglich, die Richtigkeit dieser Folgerung zu beweisen. Man bekommt durch die kinetische Analyse kein Bild der Art der Aufnahmeprozesse. Bei *Nitellopsis* (Dainty) und bei *Vallisneria* (Arisz) hat man eine periphere und eine Vakuolenmembran gefunden. Jacobson u. a. haben eine aufeinanderfolgende Reihe von Schritten angenommen, wobei jedesmal ein Träger benutzt wird, um eine Membran zu passieren. Auch die Zusammenwirkung der An- und Kationen bei der Aufnahme kann durch die einfache Trägertheorie nicht befriedigend erklärt werden. Durch diese Erwägungen war Overstreet veranlaßt, eine neue theoretische Basis zu suchen. Diese meint er in der Strukturtheorie gefunden zu haben.

Er vermutet, daß während der Aufnahme die anorganischen Ionen gebunden werden als Teile einer komplexen und labilen chemischen Struktur im Protoplasma. Kat- und Anionen werden in solchen Proportionen und in solcher Menge absorbiert, daß sie die am meisten stabilen Strukturen bilden. In diesem Bild kann man Ionenkonkurrenz und Stimulation zwischen Ionen derselben Ladung und gegenseitige Beeinflussung Ionen entgegengesetzter Ladung erwarten.

Eine kurze Mitteilung Helders (Groningen, Holland) über „Importance of cytoplasm conditioning by ionic composition of the medium on absorption capacity“ schloß sich bei den Betrachtungen Overstreets gut an. Helder erläuterte den Einfluß einer Vorbehandlung mit Salzen auf die Ionenaufnahme, sich stützend auf eigene Untersuchungen mit Gerstenkeimpflanzen und Versuche Sol's (Groningen) mit *Vallisneria*-Blättern über den Einfluß einer Vorbehandlung mit Salzen auf die Ionenaufnahme. Bei *Vallisneria* wirkt eine Vorbehandlung mit Salzen nur im Lichte. Das bedeutet, daß die Ionen während der Vorbehandlung im Plasma absorbiert sein müssen, damit sie einen Effekt bei der Aufnahme ausüben können. Die Untersuchungen weisen auf die Abhängigkeit der Ionenaufnahme von der ionären Zusammensetzung des Protoplasmas und schließen sich in überraschender Weise den älteren Ergebnissen über den Einfluß der Ionen auf die passive Permeabilität an.

Mein zweiter Vortrag wurde gehalten im Symposium „Long distance translocation in living tissues“, welches durch B. Huber organisiert war, und hatte den Titel „Observations on translocation in parenchyma and their significance for long distance translocation“.

Die beiden von mir gehaltenen Vorträge sind hier vereinigt und, soweit es erwünscht war, ergänzt.

Versuchsergebnisse

Transport in intakten Pflanzen

Die Untersuchung des Stofftransportes in Parenchymzellen erfordert ein einfaches System, das genaue quantitative Bestimmungen der anwesenden und transportierten Substanzen erlaubt. Die langen bandförmigen Blätter der *Vallisneria spiralis*, einer untergetauchten Wasserpflanze, sind dafür sehr geeignet. Eine submerse Wasserpflanze unterscheidet sich von einer Landpflanze durch das Fehlen der Transpiration, so daß keine Saugspannungen entstehen, welche eine Flüssigkeitsströmung in der Pflanze zur Folge haben. Nach Solereder haben die Blätter von *Vallisneria* Leitbündel ohne Holzgefäße, während die Siebröhren normal sind. Wenn ein *Vallisneria*-Blatt mit seinem apikalen Ende über eine Strecke von 5 bis 10 cm radioaktives Rubidium aus einer RbCl-Lösung absorbiert, speichert es die radioaktiven Rubidiumionen in seinem Gewebe und leitet diese durch das Blatt nach anderen, besonders nach jüngeren Blättern und durch Stolonen nach in Entwicklung begriffenen Vegetationspunkten. Eine derartige Wanderung in der allseitig in Wasser sich befindenden Pflanze ist völlig unabhängig von durch die Transpiration ausgelösten Saugströmen (Abb. 1 und Abb. 2).

Man kann erwarten, daß zur Kompensierung der Beseitigung des Transpirationsstromes und der Abwesenheit von Holzgefäßen, wodurch der Salztransport im Apoplast stark erniedrigt wird, gerade das symplasmatische Transportsystem sowohl im Parenchym als in den Siebröhren gut entwickelt sein wird.

Abb. 1 gibt ein photographisches Bild und ein Autoradiogramm der nach der Aufnahme lyophilisierten Pflanze. Die Pflanze absorbierte während 24 Stunden aus 4 mM RbCl mit markierten Rubidiumionen durch eine 10 cm lange Blattzone. Der Rest der Pflanze mit Ausläufern und Vegetationspunkten befand sich im Wasser.

Die Abb. 2 gibt das Resultat eines Versuches mit Aufnahme markierter Chloridionen durch den apikalen Teil (12 cm) eines Blattes aus einer 1,7 mM KCl-Lösung während 48 Stunden. Mit Ausnahme eines der Aufnahmezone sich anschließenden Blatteils war die ganze sich in Wasser befindende Pflanze belichtet.

Die Autoradiogramme zeigen:

1. Daß die radioaktiven Ionen sich in die ganze Pflanze verbreiten, auch in die Ausläufer und Vegetationspunkte, während abgeschnittene Kontrollblattstücke in demselben Wasser nicht radioaktiv werden;

2. daß eine Intensitätsabnahme stattfindet, je weiter die Ionen transportiert sind;

3. daß die Ionen, im basalen Teil der Pflanze angelangt, von dorthin in die Blätter aufsteigen; das heißt, daß der Transport an sich nicht polar ist.

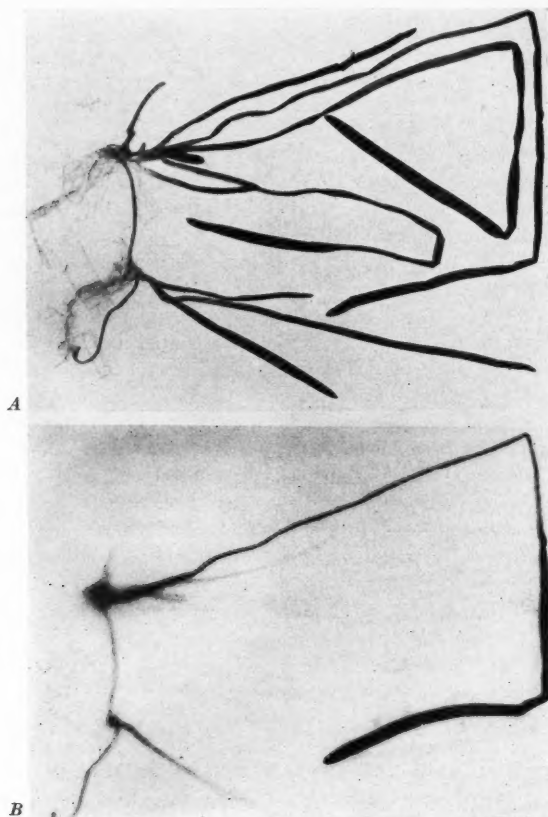


Abb. 1. A: *Vallisneria*, Pflanze nach der Aufnahme lyophilisiert. B: Autoradiogramm dieser Pflanze, Aufnahme während 24 Stunden aus einer 4 mM $Rb^{*}Cl$ -Lösung durch den 10 cm langen apikalen Teil eines Blattes. Die markierten Rubidium-Ionen wandern durch das Blatt nach der Basis der Pflanze und von da in die jungen Blätter und durch die Stolonen nach den jungen Vegetationspunkten. Die Pflanze befindet sich während des Transportes im Lichte unter Wasser.

4. Der Transport wird dadurch sichtbar gemacht, daß die im Symplasma wandernden Ionen im Plasma oder in die Vakuolen akkumuliert werden.

5. Die Ionen befinden sich in allen Zellen des Gewebes, jedenfalls ebenso in den parenchymatischen Zellen als in den Bündelzellen.

6. In welchen Elementen die Ionen geleitet werden, kann aus diesen Versuchen nicht erkannt werden.

Der Salztransport in einer unter Wasser befindlichen Pflanze erfolgt ohne Verlust von Salz, das sonst aus der Pflanze in die umgebende Lösung hinaus-

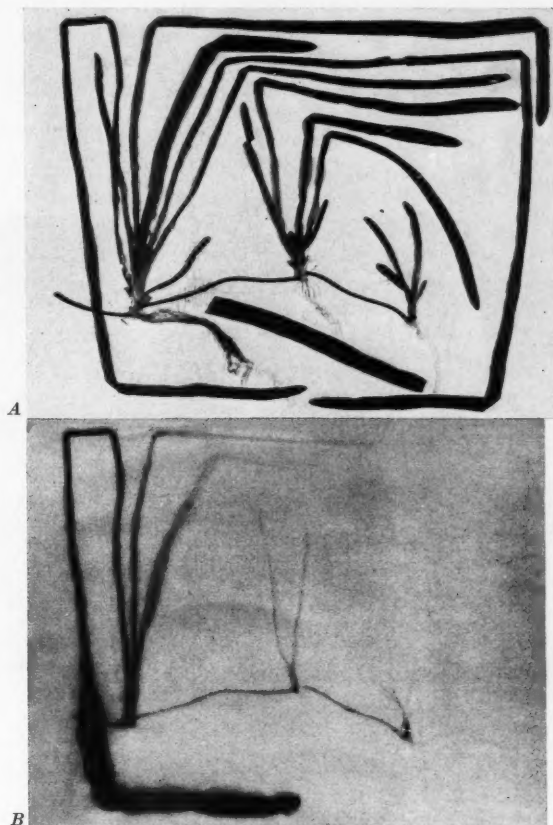


Abb. 2. A: *Vallisneria*, Pflanze nach der Aufnahme lyophilisiert. B: Autoradiogramm dieser Pflanze, Aufnahme während 48 Stunden aus einer 1,7 mM KCl*-Lösung durch den 12 cm apikalen Teil eines Blattes. Die markierten Chlorid-Ionen wandern in derselben Weise wie die Rubidium-Ionen durch das Blatt und die Pflanze. Die Pflanze befindet sich während des Transportes im Lichte unter Wasser.

diffundiert. Das bedeutet entweder, daß der Transport nicht in einem freien plasmatischen Raum stattfindet, oder, daß das Plasma durch eine für Ionen undurchlässige Membran von der Außenlösung abgegrenzt ist. Auch ist es denkbar, daß die Ionen im Plasma an Partikel gebunden sind,

mit welchen sie Komplexe formen, die so groß sind, daß sie nicht hindurchdiffundieren können. Da bei weniger resistenitem Material schon durch eine geringfügige Verletzung der plasmatischen Struktur, z. B. durch Erneuerung der Nährlösung (Arisz 1958, S. 22), die Stoffe aus den Zellen leicht abgegeben werden, ist die letztere Deutung weniger wahrscheinlich. Wir kommen auf diese Sache noch zurück. Hier sei nur betont, daß *Vallisneria*-Blätter zu einem Transport der absorbierten Salze über größere Strecken fähig sind.

Parenchymatischer Transport

Zur quantitativen Untersuchung des parenchymatischen Transportes in *Vallisneria*-Blättern (Abb. 5) haben der Einfachheit halber meistens 4 mm

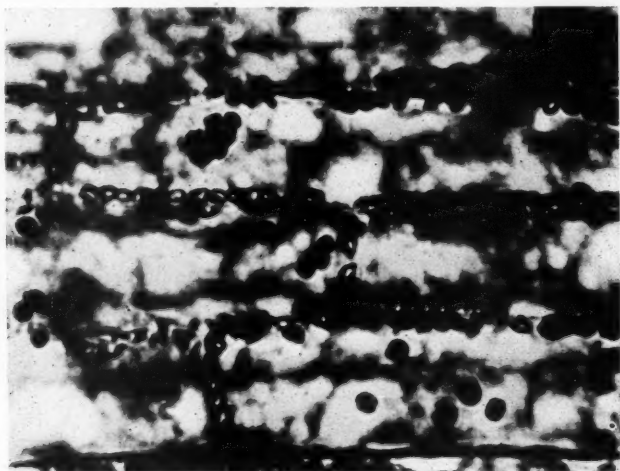


Abb. 5. *Vallisneria*-Blatt, mikroskopischer Bau.

breite Blattstücke von 5 oder 7.5 cm Länge gedient. Wir haben den Eindruck bekommen, daß dergleichen Blattsegmente sich prinzipiell wie die Blätter einer intakten Pflanze verhalten. Bei den Transportversuchen wurden Perspex-Schachteln benutzt, welche durch eine Zwischenwand, mit 8 Schlitten für die Blattstücke, in zwei Abteilungen geteilt waren. Die Öffnungen, durch die die Blätter gesteckt wurden, waren mit Vaseline und Bienenwachs abgedichtet. Der absorbierende Blatteil war immer 2.5 cm lang, der freie Teil meistens 5 cm. Am Ende des Versuches wurden die Blätter (8 in einer Serie) in 2.5 cm lange Segmente geschnitten und pro Serie analysiert. Die Blattteile befanden sich in Lösung oder zwischen zwei 3%-Agargelplatten, was besonders bei Transportversuchen ein sauberes Arbeiten erleichterte (Abb. 4). Bei Aufnahmeversuchen mit Isotopen erfolgte die Aufnahme aus Lösungen. Benutzt wurden Rubidium 86, Chlor 36, Phosphor 32 und Calcium 45.

Die Blätter zeigen unter günstigen Umständen eine intensive Aufnahme und Wanderung von Salzen und Aminosäuren (Arisz und Oudman 1938, Arisz 1948). Diese Substanzen sind als Ionen anwesend: Anionen, Kationen und Zwitterionen, welche aufgenommen werden unter Verbrauch von Energie, die durch Photosynthese oder Atmung geliefert wird. Daher haben Beleuchtung und Zuckerzusatz einen günstigen Einfluß auf die Aufnahme.

Belichtung kann auch ohne Anwesenheit von Kohlensäure, also ohne Bildung von Assimilaten eine Vergrößerung der Aufnahme zustande bringen. Das Aktionsspektrum der Chloridaufnahme ist, wie van Lookeren Campagne festgestellt hat, identisch mit dem der Kohlensäureassimilation. Das weist auf die Tätigkeit des Chlorophylls bei der Bildung einer energiereichen Substanz, welche bei der Salzaufnahme benutzt wird.

Es kann hier nur kurz erwähnt werden, daß Arisz und Sol kürzlich gezeigt haben, daß Belichtung der freien Zone auf die Aufnahme und Akkumulation in der Absorptionszone einen Einfluß ausübt. Dieser kann gedeutet werden als Transport einer in der freien Zone im Licht gebildeten energiereichen Substanz nach der Absorptionszone. Diese Substanz kann nicht Zucker sein, da der Effekt auch bei Belichtung mit gleichzeitiger Zufuhr von Zucker zu beiden Zonen gefunden wird.

Es wurde gefunden, daß Vorbehandlung mit Licht eine später folgende Aufnahme von Chlorid erhöht. Dieser Einfluß der Vorbelichtung kann nach angrenzenden nicht belichteten Blattteilen fortgeleitet werden und weist auf die Bildung spezifischer Stoffe im Lichte hin, die bei der Aufnahme eine Rolle spielen.

Auch Laties hat die Anwesenheit von Stoffen, die bei der Aufnahme eine Rolle spielen, in Versuchen mit Wurzelsystemen zeigen können, wenn er durch Temperaturniedrigung die Zerstörung der im Lichte gebildeten Stoffe verringert. Dergleichen Stoffe können auch wohl als Träger betrachtet werden. Hoffentlich wird es ihm bald möglich sein, sie zu isolieren.

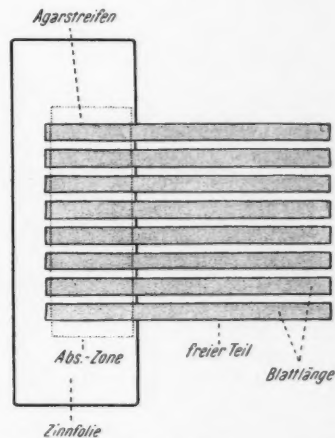


Abb. 4. Acht Blattstücke, 7,5 cm lang, befinden sich mit der Absorptionszone (2,5 cm) in einer Stanniol-dose zwischen zwei 3% Agar-agar-Platten, in welchen eine Salzlösung anwesend ist. Der freie Teil des Blattes ist entweder in feuchter Luft oder zwischen Agar-agar-Platten. Bei späteren Versuchen sind meistens Dosen aus opakem Perspex mit durchsichtigen Deckeln, in zwei oder drei Kompartimente geteilt, benutzt worden (Arisz, *Protoplasma* 46, 1936).

Symplasma

Die Anwesenheit von Plasmaverbindungen oder Plasmodesmen zwischen benachbarten Zellen ermöglicht den Transport von Stoffen im Gewebe durch ununterbrochene plasmatische Bahnen. Münch benutzte den Terminus Symplasma, welcher sehr geeignet ist, die Kontinuität des Plasmas in benachbarten Zellen auszudrücken (Abb. 5).

Osmotischer Druckstrom im Symplasten

Münch denkt sich das Symplasma von einer semipermeablen Membran umgeben. Dadurch entsteht ein osmotisches System, das geschieden ist vom Apoplast, dem toten Teil des Gewebes. Im Symplast der Parenchymzellen werden die osmotischen Substanzen, die bei der Kohlensäure-Assimilation im Cytoplasma gebildet werden, transportiert. Es versteht sich, daß

Münch den osmotischen Kräften ebenso wohl bei dem Transport im parenchymatischen Gewebe als bei dem in den Siebröhren eine wichtige Rolle zugeschrieben hat. Er meint, daß bei Siebröhren die Vakuolenhaut permeabel ist und die Stoffe in den Vakuolen wandern, während die Plasmodesmen offene Schläuche bilden.

Die Münchsche Theorie über den symplastischen Transport in den Parenchymzellen durch den osmotischen Druck war anziehend. Sie beruht auf

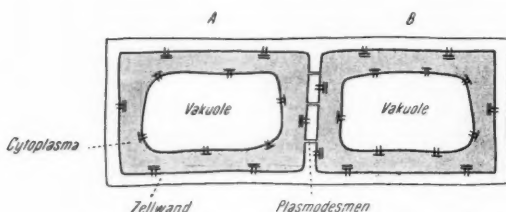


Abb. 5. Schema eines transportierenden Blattes. Zwei Zellen mit Wand, Cytoplasma und Vakuole stehen durch Plasmodesmen miteinander in plasmatischer Verbindung. Die Salzionen werden durch aktive Aufnahme in das Cytoplasma der linken Zelle eingeführt und wandern durch die Plasmodesmen nach der angrenzenden Zelle. Aus dem Plasma werden die Ionen aktiv in die Vakuole sezerniert (Arisz, Protoplasma 46, 1956).

der Hypothese, daß eine semipermeable Membran an der Oberfläche des Plasmas anwesend ist. Leider hat Münch das Bestehen der semipermeablen Membran ohne weiteres angenommen und für die Funktion der Plasmodesmen bei dem Transport keinen zwingenden Beweis geliefert. Schumacher und Lundegårdh haben ebenso wie vorher Pfeffer die Bedeutung der Plasmodesmen für den Transport abgelehnt. Später haben verschiedene Autoren, u. a. Crafts, Broyer, Scott Russell und Sutcliffe, den symplastischen Transport in Parenchymzellen als selbstredend angenommen.

Broyer zeigte (1950), daß der Bromidtransport durch die Wurzelrinde nach dem Xylem in Bahnen außerhalb der Vakuolen stattfindet. Es blieb aber in seinen Versuchen unsicher, ob die Salze in der Wurzelrinde durch das Plasma oder durch die Zellwände nach den Xylemgefäßen geleitet wurden.

Aktive Aufnahme in das Symplasma

Viele Untersuchungen haben gezeigt, daß die Aufnahme nicht permeierender Stoffe nur unter Energieaufwand stattfinden kann. Die aktiv absorbierten Salze können an verschiedenen Stellen in das Protoplasma oder in die Vakuolen akkumuliert, gebunden oder sezerniert werden. Wenn die ersten 2,5 cm eines *Vallisneria*-Blattes eine Salzlösung aufnehmen, wird zunächst in den an die Lösung grenzenden Zellen Salz aufgenommen und nach den benachbarten nicht peripheren Zellen geleitet. Nach einiger Zeit ist eine Speicherung erfolgt. Es konnte gezeigt werden, daß mehrere Enzymgifte wie KCN, Arsenit, Arsenat, Azid, Jodazetat und Uranyl-nitrat die aktive Absorption von Chlorid hemmen. Die Aufnahme ist aber ein komplizierter, mit dem Stoffwechsel verbundener Prozeß, der aus verschiedenen Teilreaktionen besteht, so daß man nicht feststellen kann, welcher Schritt gehemmt wird. Hier hat die Untersuchung mit *Vallisneria*-Blättern eine wichtige Aufklärung möglich gemacht. Denn es ist möglich, den Hemmstoff entweder in der aufnehmenden Zone zu verabreichen oder in der angrenzenden freien Zone, wo die Stoffe nicht direkt aus der Außenflüssigkeit aufgenommen, sondern durch die Absorptionszone zugeführt werden. Dadurch kann man den Einfluß des Hemmstoffes auf die Aufnahme aus der Nährlösung von seinem Einfluß auf die Translokations- und Sekretierungsprozesse scheiden. In der aufnehmenden Zone kann der Hemmstoff ebensowohl auf die Aufnahme in das Plasma als auf die Sekretion in die Vakuole einwirken, in der freien Zone aber nur auf die Sekretion in die Vakuole.

Falls ein Unterschied in der Wirkung gefunden wird, muß das darauf beruhen, daß nur der Aufnahmeprozess *sensu stricto* gehemmt wird. Die Hemmung der Wanderung wird später behandelt.

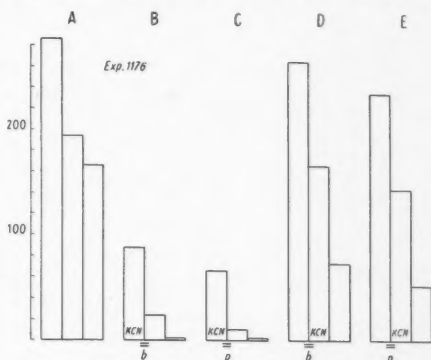


Abb. 6. Bei dieser und den folgenden Figuren wird 0,001 mol KCl + CaSO₄ im Lichte während 24 Stunden bei 25° C durch die erste Zone aufgenommen. Nach der Aufnahme wird das 7,5 cm lange Blattstück in drei Segmente zerlegt und per Segment analysiert. Auf der Ordinate steht die Chloridzunahme von jedem Segment in µg.

Hemmung der Chloridaufnahme und des Transportes der Cl-Ionen durch KCN $5 \cdot 10^{-4}$ mol bei pH 7. A: Normale Aufnahme in der ersten Zone und Transport nach der zweiten und dritten Zone. In B und C ist KCN der Aufnahmezone in D und E der Mittelzone verabreicht. In B und D ist eine Leitbündelbrücke, in C und E eine Parenchymbrücke hinter der ersten Zone (Arisz 1958).

Hemmung der Aufnahme in das Plasma

1953 habe ich bei besonders kräftig sich entwickelnden *Vallisneria*-Pflanzen gefunden, daß KCN, der Aufnahmezone zugeführt, die Aufnahme und Akkumulation von Chlorid in dieser Zone völlig hemmt und gleichzeitig auch die Akkumulierung in der freien Zone aufgehoben wird (Abb. 6). KCN, in derselben Konzentration der freien Zone zugeführt, hemmte aber die Akkumulation nicht. Das bedeutet, daß in diesem Versuch KCN nicht die Akkumulation in die Vakuole hemmt, sondern die Aufnahme in das Cytoplasma, wodurch ebenfalls die Salzzufuhr zu den freien Zonen und die Vakuolenakkumulation in diesen Zonen verhindert wurde.

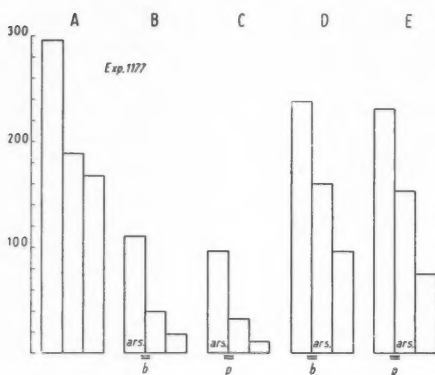


Abb. 7

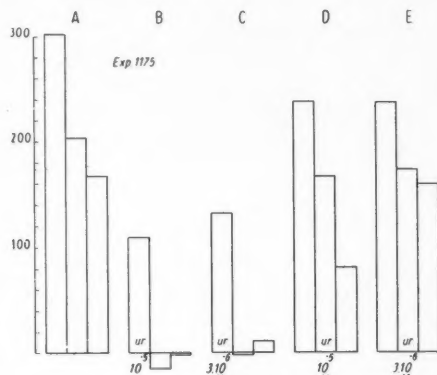


Abb. 8

Abb. 7. Hemmung der Aufnahme und des Transportes von Chlorid durch $5 \cdot 10^{-6}$ mol Natriumarsenat. In B und D eine Leitbündelbrücke (b), in C und E eine Parenchymbrücke (p) (Arisz 1958).

Abb. 8. Hemmung der Aufnahme und des Transportes von Chlorid durch 10^{-5} mol Uranyl nitrat in B und D, durch $3 \cdot 10^{-5}$ mol in C und E. Der Hemmstoff ist in B und C der Absorptionszone, in D und E der Mittelzone verabreicht (Arisz 1958).

Die Versuche sind in den folgenden Jahren öfters wiederholt und erweitert worden. Ich konnte 1958 mitteilen, daß es gelungen war, Material heranzuzüchten, das eine vollständige Bestätigung gab mit drei verschiedenen Hemmstoffen, KCN, Natriumarsenat (Abb. 7) und Uranyl nitrat (Abb. 8). Welche biochemische Reaktion dabei gehemmt wird, ist fraglich. Es kann der Durchgang durch eine Membran sein, der direkt durch das Cytochromsystem vermittelt wird oder von der Lieferung energiereicher Phosphate abhängig ist (Higinbotham 1959). Es kann auch eine Ionenbindung an die Träger oder an die Plasmamoleküle selbst sein. Auch kann es die Bildung der Träger sein, welche die Aufnahme vermitteln (Scott Russell).

Die Akkumulation ist nicht immer bei *Vallisneria*-Blättern so unempfindlich für diese Hemmstoffe, wie oben erwähnt wurde. Bei Material, unter

anderen Umständen aufgezogen, wurde auch die Akkumulation in die Vakuole gehemmt (Abb. 9). Dennoch wurde auch hier ein verschiedener Effekt bei Verabreichung in der Aufnahmezone und in einer freien Zone erhalten. Die Hemmung der Chloridaufnahme in der Absorptionszone erfolgt schon bei einer niedrigen KCN-Konzentration und zu gleicher Zeit wird auch der Transport gehemmt. Bei Verabreichung in der freien Zone ist die Hemmung meistens schwächer, während der Transport bei diesen niedrigen Konzentrationen nicht gehemmt ist. Prinzipiell sind diese Resultate ebenso wichtig wie die erstgenannten und zeigen, das KCN immer die aktive Aufnahme in das Plasma hemmt. Diese Folgerung muß der früheren Besprechung (Arisz 1958) hinzugefügt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse hat man wenigstens vier Teilprozesse bei der Salzaufnahme zu unterscheiden:

1. Ionendiffusion in den plasmatischen freien Raum, teilweise Ionentausch im Donnan-Raum,

2. aktive, das ist vom Stoffwechsel abhängige Aufnahme in das zentrale Plasma,

3. aktive Sekretion der Ionen in die Vakuolen,

4. Wanderung der Ionen im Symplasma.

Die Funktion der Plasmodesmen

Derselbe Versuch zeigt auch, daß wir es bei *Vallisneria* mit einer Wanderung der Chlorionen im Symplasma zu tun haben und nicht mit einer Wanderung durch die Zellwände oder den freien plasmatischen Raum. Würde die Salzlösung durch die Zellwände nach den freien Zonen geleitet, so hätte KCN, in der freien Zone verabreicht, die Aufnahme in das Plasma hemmen müssen. Da aber die Speicherung in der freien Zone nicht geändert wird, hat keine Zufuhr durch die Wände stattgefunden. Es ist selbstredend ausgeschlossen, daß bei submersen Wasserpflanzen ein Salztransport durch die Wände oder durch den plasmatischen freien Raum eine bedeutende Rolle spielen kann. Der interzelluläre Transport der Chloridionen findet also im Symplasma statt, ohne daß die Ionen das Plasma verlassen. Das ist

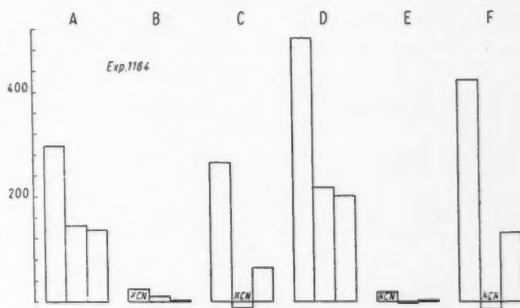


Abb. 9. Versuch mit Material, bei welchem auch die Sekretion aus dem Plasma durch KCN gehemmt wird. Bei B und E ist KCN 10^{-5} mol der Absorptionszone verabreicht, bei C und F der Mittelzone. Bei D, E und F ist allen Zonen Zucker 0,05 M verabreicht. Der Transport in C und F aus der zweiten zur dritten Zone wird nicht oder nur schwach gehemmt (Arisz 1958).

der physiologische Beweis der Bedeutung der Plasmodesmen für den Transport.

Verträglichkeit zwischen Symplasma und „free space theory“

In bezug auf die „Free space theory“ von Briggs und Robertson kann gesagt werden, daß die Symplasmatheorie und die Annahme eines freien plasmatischen Raumes nicht miteinander in Widerspruch sind. Würde man voraussetzen, daß das Plasma wie ein Schwamm ein System zusammenhängender Löcher zwischen den Makromolekülen der Plasmastrukturen besitzt und eine Außenmembran nicht anwesend ist, dann würden bei einer in Wasser gestellten Pflanze die im freien Raum anwesenden Salze sofort abgegeben werden. Da aber der Salztransport unter diesen Umständen fortgesetzt wird, müssen wir folgern, daß dann die Ionen während des Transportes an die makromolekularen Strukturen gebunden bleiben würden. Die Wanderung der Ionen von Zelle zu Zelle würde dann die Fortsetzung der plasmatischen Strukturen auch in den Plasmodesmen fordern. Die Frage, ob die Salze im Symplasma transportiert werden, ist also unabhängig von der Auffassung über die Bedeutung und die Größe des freien plasmatischen Raumes.

Nach Daten von Kylin, bestätigt durch Winter (Groningen), ist die „Apparent free space“ bei *Vallisneria*-Zellen 5–7%. Es sind auch eine gewisse Anzahl austauschfähiger Kationen anwesend. Wie schon früher Epstein und Leggett bei Wurzeln nach Strontiumaufnahme gefunden hatten, konnte Winter bei *Vallisneria*-Blättern nach Rubidiumaufnahme zeigen, daß Blätter, die nach der Aufnahme in Wasser gestellt wurden, neben fixierten auch noch austauschbare Rubidiumionen besaßen. Die fixierten Ionen werden weder an das Wasser abgegeben noch für Kationen der Außenlösung ausgetauscht. Während des Aufenthaltes in Wasser verringerte sich die Anzahl der austauschbaren Ionen und nahm die Anzahl gebundener Ionen zu.

Kationenwanderung in der Zelle bei der aktiven Aufnahme

Die aktive Ionenbindung wird also während des Aufenthaltes in Wasser fortgesetzt, bis nach einer Stunde die meisten austauschfähigen Ionen fixiert worden sind. Wo die austauschfähigen Rubidiumionen lokalisiert waren, ist unsicher. Sie waren entweder in den Wänden oder im Plasma adsorbiert. Hier kann nur betont werden, wie merkwürdig es ist, daß diese austauschbaren Ionen fast quantitativ unter dem Einfluß des Absorptionsmechanismus fixiert werden, ohne daß sie unterwegs an das umgebende Wasser abgegeben werden. Wir haben hier ein Beispiel, daß adsorbierte Ionen in der Zelle wandern können. Das kann vielleicht fundamentale Bedeutung haben als Prototyp der Weise, wie Ionentransport in der Zelle stattfindet. Es erinnert uns an die Theorie der „Surface migration“ von Jenny und Overstreet (1939).

Ionenaustausch bei im Symplasma wandernden Ionen

Bei der Aufnahme in *Vallisneria*-Blätter werden die Anionen direkt irreversibel im Plasma gebunden und können nachher nicht ausgetauscht werden, im Gegensatz zu den Kationen, bei welchen immer ein kleiner Teil ausgetauscht werden kann. Beim Salztransport kann man deshalb erwarten, daß die Anionen auch während der Wanderung nicht gegen Ionen aus der umgebenden Lösung ausgetauscht werden können.

In betreff der Kationen kann die Frage gestellt werden, ob die wandernden Ionen oder Plasmapartikel irreversibel fixiert, locker gebunden oder frei sind. Wenn eine Außenmembran anwesend ist und für die Kationen

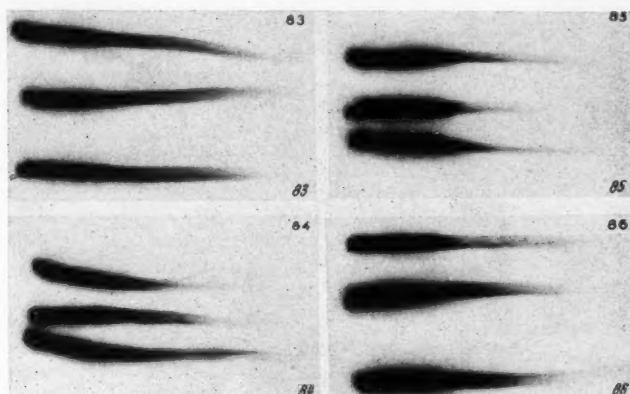


Abb. 10. Kationenaustausch markierter Rubidium-Ionen während ihrer Wanderung in den freien Zonen. In allen Serien erst Aufnahme während 4 Stunden aus $\text{RbCl} + \text{CaSO}_4$ -Lösung mit markiertem Rubidium in der ersten Zone. In den folgenden 24 Stunden wird die Aufnahme markierter Rubidium-Ionen in der ersten Zone fortgesetzt. In dieser Zeit sind die zweite und dritte Zone bei 83 in Wasser, bei 84 in K_2SO_4 , bei 85 in KCl , bei 86 in KNO_3 . Die Menge der transportierten markierten Rubidium-Ionen ist in Wasser am größten, in KCl (85) am schwächsten. Die Aufnahme von KCl in die Mittelzone (85) verursacht eine Stauung der markierten Rubidium-Ionen in der Absorptionszone. Der Austausch markierter Rubidium-Ionen gegen Kalium-Ionen aus der umgebenden Lösung ist nur schwach.

permeabel ist, werden diese im zweiten und dritten Fall austauschbar sein für Kationen in der Außenlösung. Diese Frage kann mit Hilfe von allseitig aufnehmenden Blattstücken nicht gelöst werden, da nach dem Kontakt mit der Lösung immer eine Anzahl adsorbierter austauschbarer Kationen anwesend sein wird. Bei *Vallisneria*-Blättern mit Aufnahme- und Transportzonen kann das Problem studiert werden, ob die Kationen austauschbar sind, während sie in der freien Zone transportiert werden.

In Versuchen mit 7,5 cm langen Blattstücken (Abb. 10) wurde während der Aufnahme von markiertem Rubidiumchlorid durch die Aufnahmezone der freie Blatteil in Rubidiumlösungen (RbCl , Rb_2SO_4 , RbNO_3) ohne mar-

kierte Ionen gestellt, um einen Austausch der markierten Kationen, die in der freien Blattzone wandern, gegen die nicht markierten in der Außenlösung zu erzielen. Es ergab sich, daß der Austausch sehr niedrig war, während in den freien Zonen die aktive Aufnahme von nicht markierten Rubidiumionen aus diesen Lösungen ziemlich groß war, am größten bei RbCl , wovon auch das Anion stark akkumuliert wird. Die Versuche weisen nicht auf eine leichte Austauschbarkeit der markierten Kationen während des Transportes. Die Kationen werden daher vermutlich gleich wie die Anionen während der Wanderung nicht ausgetauscht, was darauf hinweist, daß sie schon vorher aktiv aufgenommen waren (Arisz 1960).

Austausch zwischen Ionen in angrenzenden Vakuolen

Eine zweite prinzipielle Frage ist, ob die Ionen, die in einer Vakuole akkumuliert sind, noch ausgetauscht werden können gegen Ionen, die sich

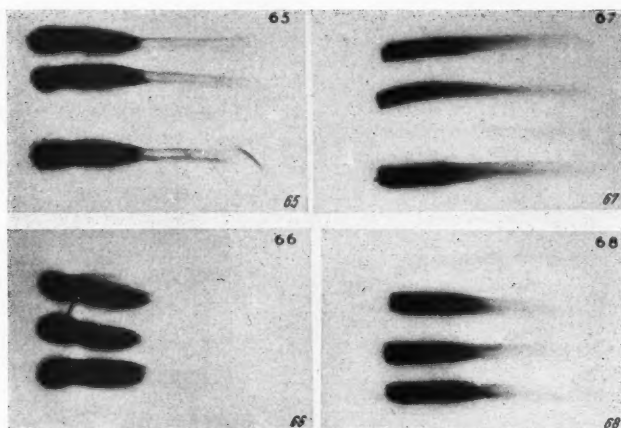


Abb. 11. Ionenaustausch zwischen angrenzenden Blattzonen. In 65 und 66 wird in der linken Blatthälfte in den ersten 4 Stunden KCl mit markiertem Chlorid, in 67 und 68 RbCl mit markiertem Rb aufgenommen. Die rechte Blatthälfte ist bei 65 und 67 4 Stunden in Wasser, bei 66 und 68 4 Stunden in nicht markiertem KCl ; nach diesen 4 Stunden werden alle Serien in Wasser übertragen. Nach 36 Stunden Aufenthalt in Wasser ist das Autoradiogramm hergestellt. Die Aufnahme nicht markierter Ionen in der rechten Hälfte hemmt den Transport der markierten Ionen aus der linken Hälfte. Ionenaustausch zwischen beiden Hälften ist unbedeutend.

im Plasma oder in anderen Vakuolen befinden. Wir wissen leider nicht, ob die Ionen, welche bei der aktiven Aufnahme in das zentrale Plasma angelangt sind, frei oder gebunden sind. Einige Versuche (Abb. 11) mit radioaktivem Chlorid und radioaktivem Rubidium über die Möglichkeit Ionen zwischen angrenzenden Vakuolen auszutauschen, haben ein negatives Resultat gegeben. Eine 2,5 cm lange Zone eines 5 cm langen Blattes akkumulierte während vier Stunden markiertes Rb aus einer Rb^*Cl - oder markiertes

Chlorid aus einer KCl^* -Lösung. Die angrenzende Zone von 2,5 cm befand sich entweder in Wasser oder in einer nicht markierten KCl -Lösung. Nur wenn die angrenzende Zone sich in Wasser befand, konnte eine normale Wanderung markierter Ionen gezeigt werden. War die angrenzende Zone in KCl -Lösung, so wurden dort nur nicht markierte K- und Cl-Ionen akkumuliert. Der Austausch während 36 Stunden zwischen den in den Vakuolen der beiden Zonen anwesenden markierten und nicht markierten Ionen durch Vermittlung von Ionen im Plasma war jedenfalls sehr schwach. Da die Ionen im Plasma wandern können, während sie in den Vakuolen osmotisch wirksam sind, ist hieraus zu folgern, daß ein Austausch von Rubidium- und Chlorid-Ionen durch die Vakuolenmembran nicht stattfindet.

Es kann hier in Erinnerung gebracht werden, daß unsere früheren Versuche (Arisz 1954 und 1956, Fig. 10) über Redistribution zu derselben Folgerung geführt haben.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß jedenfalls die hier untersuchten Ionen nicht freiwillig aus den Vakuolen herausdiffundieren können und auch nicht mit Ionen im zentralen Plasma austauschen können.

Ionen-„pool“ im zentralen Plasma

Es besteht keine Gewißheit, ob die Ionen, die von außen in das Plasma eingetreten sind, sofort in die Vakuolen sezerniert werden oder erst in einen „pool“ kommen und aus diesem „pool“ zugleich mit da schon anwesenden Ionen in die Vakuolen sezerniert werden (Arisz 1958). Über die Größe dieses Ionenpools kann noch nichts Bestimmtes gesagt werden. Es ist aber aus den eben besprochenen Resultaten wahrscheinlich geworden, daß auch die im Symplasma wandernden Ionen zu diesem pool gehören.

Auch auf andere Weise kann das Vorhandensein eines „Ionenpools“ festgestellt werden. Wenn die Ionen, die aufgenommen werden, markiert sind, kann man untersuchen, ob die wandernden Ionen alle oder nur teilweise markiert sind. Die totale Menge der aufgenommenen Ionen muß natürlich dieselbe sein, ob die Ionen markiert sind oder nicht, jedoch ihre Verteilung über die Blattzonen kann verschieden sein. Bei der Aufnahme von Kaliumchlorid hat man die in jeder Zone vor und nach der Aufnahme anwesende Menge Chlorid chemisch zu bestimmen, so daß Aufnahme und Transport in den verschiedenen Zonen bekannt sind. Frau Havinga van der Molen hat in meinem Laboratorium die Aufnahme und den Transport markierter und nicht markierter Chlorid-Ionen durch Zählung der radioaktiven Ionen und chemische Analyse der totalen Menge Chlorid verglichen und sehr verschiedene Resultate bekommen. Eigene Versuche mit markierten Chlor- und Rubidiumionen sind noch nicht abgeschlossen. Sie bestätigen ihre Erfahrung, daß die Resultate variabel sind. Das wird hauptsächlich durch die variable Geschwindigkeit des Transports verursacht, die sehr abhängig ist von der Vorbehandlung, der Aufzucht und dem Alter der Pflanzen. Die erhaltenen Resultate weisen meines Erachtens auf die Anwesenheit eines „Ionenpools“. Ist der pool groß im Verhältnis zu der Menge der aufgenommenen Ionen, so tritt, wenn die Geschwindigkeit der

Ionenwanderung nur schwach ist, anfangs die Erscheinung auf, daß die Anzahl der wandernden markierten Ionen viel kleiner ist als die der nicht markierten Ionen. Beim Beginn der Aufnahme werden die markierten Ionen verhältnismäßig in größerer Anzahl in der Aufnahmezone gebunden und sezerniert und in geringerer Menge nach den freien Zonen transportiert.

Die markierten Ionen kommen bei der Aufnahme in einen pool, wo bereits nicht markierte Ionen anwesend sind, und aus diesem pool werden anfangs mehr nicht markierte Ionen fortgeleitet. Dauern die Versuche länger, so wird im Ionenpool die relative Menge der markierten Ionen zunehmen und werden auch relativ mehr markierte Ionen transportiert werden. Auch wenn bei günstigem Material der Transport intensiver ist, wird sich das Verhältnis zwischen markierten und nicht markierten Ionen schneller zugunsten der markierten Ionen ändern.

Hieraus geht hervor, daß man aus einer Bestimmung der transportierten markierten Ionen noch keine Folgerung ziehen kann über die wirkliche Größe des Transportes und über die Geschwindigkeit der Wanderung.

Bei der Wanderung der Kationen bietet sich ein analoges Problem. Werden markierte Rubidiumionen absorbiert, so werden diese zusammen mit nicht markierten Kationen, welche schon im Symplasma anwesend waren, wie z. B. Kaliumionen, wandern. Die Anzahl der wandernden Kationen muß natürlich ebenso groß sein, wie die der wandernden Anionen. Das Problem der Ionenwanderung im Symplasma ist kompliziert und muß noch weiter untersucht werden. Das kann vielleicht auch für unser Verständnis des Transportmechanismus wertvoll sein.

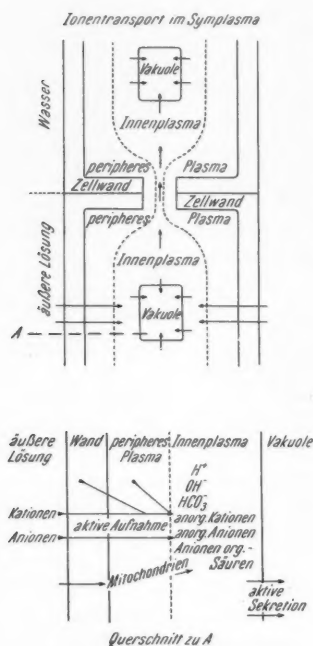


Abb. 12. Schematische Vorstellung des symplastischen Ionentransportes. Die Ionen kommen nach der aktiven Aufnahme in einen „Pool“ im zentralen Plasma. Aus diesem „Pool“ werden sie entweder in die Vakuolen sezerniert oder in dem Symplasma weitergeleitet (Arisz 1960).

Schema der Aufnahme- und Transportprozesse

Auf Grund der jetzt bei *Vallisneria* bekannten Daten ist ein Schema (Abb. 12), das 1958 vorgeschlagen wurde (Arisz 1958, Abb. 31), revidiert worden. Es sind aber auch jetzt noch verschiedene Punkte unvollständig untersucht.

Gleichzeitiger Transport von Asparagin und Kaliumchlorid

Jetzt werden wir den Transportprozeß näher besprechen, und beginnen mit dem gleichzeitigen Transport von KCl und Asparagin. Wir haben schon gesehen, daß Aminosäuren und Asparagin in *Vallisneria*-Blättern aktiv aufgenommen und fortgeleitet werden. Der Prozeß findet prinzipiell in ähnlicher Weise statt wie der Transport von Kaliumchlorid. Die in unseren Versuchen aktiv aufgenommenen Substanzen sind alle in Ionen dissoziiert: Anionen, Kationen und Zwitterionen. Falls Chlorid in die Richtung A-B-C wandert und gleichzeitig Asparagin in die entgegengesetzte Richtung, beeinflussen die beiden Prozesse einander nicht (Tabelle 1). Dennoch ist es

Tab. 1. Gleichzeitiger Transport von 0,01 mol KCl und 0,01 mol Asparagin in derselben und in der entgegengesetzten Richtung. I: Chlorid und Asparagin wandern von A nach C. II: Chlorid wandert von A nach C, Asparagin von C nach A. Aufnahme 24 Stunden im Lichte bei 25° C. Die Zunahme von Chlorid und Stickstoff in µg.

		A		B		C
		KCl + Asparagin				
I	Chlorid in µgr	279	→	144	→	66
	N in µgr	189	→	III	→	29
		KCl		Asparagin		
II	Chlorid in µgr	301	→	123	→	52
	N in µgr	33	←	109	←	157

wahrscheinlich, daß beide Stoffe das Symplasma gleichzeitig in entgegengesetzten Richtungen durchwandern. Das deutet darauf hin, daß der Transport keine Massenbewegung einer Lösung ist, welche durch osmotische Kräfte verursacht wird. Diese unabhängige gleichzeitige Wanderung von Ionen verschiedener Art ist in Harmonie mit dem Symplasmagedanken. Jedes Ion wandert gemäß dem Konzentrationsgefälle dieser Ionenart im Symplasma.

Das Fehlen einer Polarität der Ionenwanderung

Wie auch aus vielen anderen Versuchen hervorgegangen ist, ist die Ionenwanderung in *Vallisneria*-Blättern nicht polar und findet in beiden Richtungen statt. Auch in der intakten Pflanze ist, wie aus den Autoradiogrammen (Abb. 1 und 2) hervorgeht, der Transport nicht polar. Die Ionen gehen ebensogut nach der Blattbasis wie von dort zu den Blattspitzen.

Nach Angabe von Sutcliffe (1959) sollte die Ionenwanderung bei *Vallisneria* polar sein. Das kann vielleicht so verstanden werden, daß in seinen Versuchen die nach der Basis transportierte Menge größer war als die der nach der Spitze geleiteten Ionen. Ein derartiges Resultat kann verursacht werden durch eine stärkere Bindung oder Speicherung der Ionen im basalen Teil der Pflanze. Die Polarität beruht dann auf der Lage und Größe des „Sink“, das ist der Stelle, wo die Stoffe gespeichert oder sezerniert werden, und nicht auf einer Polarität der leitenden Zellen.

Konzentrationsdifferenzen bestimmen die Transportrichtung

Die Richtung des Transportes wird vermutlich durch Konzentrationsdifferenzen im Symplasma bestimmt. Die Konzentration wird höher, wenn aktiv Salz in das Plasma eingeführt wird, schwächer, wenn aus dem Plasma Salz in die Vakuolen sezerniert, bei Synthesen festgelegt oder fortgeleitet wird.

Transportbahn

Untersuchungen mit Autoradiogrammen über die Transportbahn von Salzen mit radioaktiven Ionen wie Rb⁸⁶ und Chlor³⁶ haben gezeigt, daß die Ionen sich auf dem Querschnitte ziemlich gleichmäßig über die verschiedenen Gewebe verteilen und deutlich das Bild einer Diffusion zeigen.

Eine nähere Bestimmung der Transportbahn kann man erreichen, wenn man am Ende der Absorptionszone über eine kurze Strecke von 4 bis 16 mm entweder die Bündel oder das zwischen den Bündeln sich befindende Parenchymgewebe entfernt (Arisz und Schreuder 1956). Meistens wurde das mittlere Gefäßbündel oder zwei Parenchymstreifen isoliert. Der Transport markierter Chlorid- und Rubidium-Ionen passiert dergleichen Brücken leicht und in 7,5 cm langen Blattstücken mit 4 mm langen Brücken ist der Transport wie normal. Längere Parenchymbrücken sind weniger resistent und funktionieren weniger gut. Bündelbrücken von 16 mm Länge erlauben noch einen normalen Transport. Bei Versuchen mit ganzen Pflanzen wird der Transport durch eine Bündelisolierung über eine Strecke von 1 cm nicht merkbar gehemmt.

In der Abb. 13 sieht man den Transport der markierten Chloridionen bei weniger intensiv transportierenden Blättern. Diese sind besser geeignet, die Art des symplastischen Transportes sichtbar zu machen, als gut transportierende Blätter, bei welchen die feinen Differenzen durch die starke Akkumulation schwer zu unterscheiden sind.

Man findet in den Autoradiogrammen die radioaktiven Ionen immer gleichzeitig in den Leitbahnen und im Parenchymgewebe (Abb. 14). Bei Parenchymbrücken treten die Ionen aus den Parenchymzellen unmittelbar in die benachbarten Bündel ein und bei Leitung durch Bündelbrücken treten sie nach Passage der Brücke unmittelbar in die Parenchymzellen ein. Das beweist, daß auch die Elemente der Bündel, welche für die Salzleitung sorgen, und dabei müssen wohl die Siebröhren sein, zum symplastischen System gehören. Wir begründen in dieser Weise, daß bei dem Transport im Symplasma der *Vallisneria*-Blätter die Siebröhren und die Parenchymzellen in gleicher Weise beteiligt sind. Sie bilden ein zusammenhängendes Ganzes.

Hier darf noch auf neue Untersuchungen hingewiesen werden über den Zusammenhang zwischen dem Zuckertransport in Siebröhren und in Parenchymzellen, welche ebensowohl auf eine symplastische Stoffleitung hinweisen.

Kennedy und Mittler haben eine Methode ausgearbeitet, Saft-

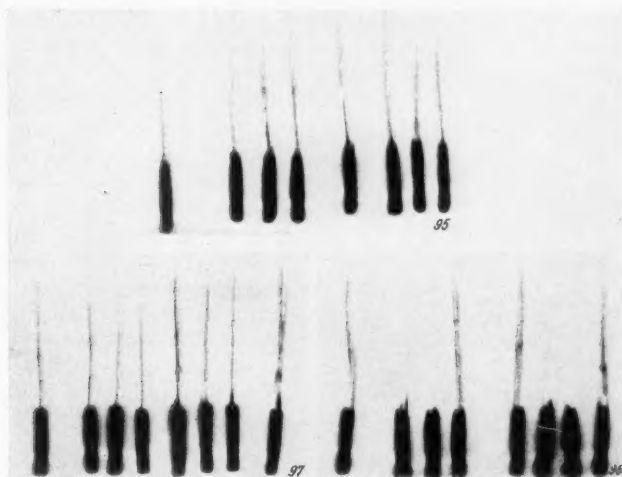


Abb. 15. Symplasmatischer Salztransport. Aufnahme und Transport von markiertem Chlorid aus einer 1,6 mM Kaliumchlorid-Lösung, 24 Stunden. Die Aufnahmezone ist stark überstrahlt durch die starke Speicherung radioaktiven Chlors. Oben: Die intakten Blattstücke zeigen eine schwache Ionenwanderung im ganzen Gewebe. Unten rechts: Ein Versuch mit zwei Parenchymbrücken hinter der Aufnahmezone. Bei mehreren Blattstücken war die Verwundung Ursache eines schlechten Transportes. Das Fehlen markierten Chlors in den freien Zonen dieser Blattstücke ist eine schöne Kontrolle, daß die freien Zonen kein markiertes Chlorid aus der umgebenden Flüssigkeit aufgenommen haben. Bei den Blattstücken unten links ist hinter der Aufnahmezone nur eine Leitbündelbrücke anwesend. Das angrenzende Parenchymgewebe ist, soweit es möglich war, entfernt worden. In allen Abbildungen ist zu sehen, daß sobald die Brücke passiert ist, das markierte Chlorid ebensowohl im Gefäßbündel wie im Parenchym wandert.

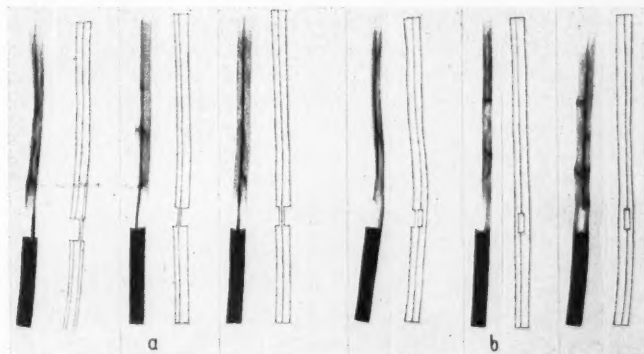


Abb. 14. Einzelne der in Abb. 15 operierten Blätter werden hier mit der Verteilung des markierten Chlors verglichen. Zeichnung: a Bündelbrücken, b Parenchymbrücken.

ausfluß aus den Siebröhren zu erzielen. Sie benutzen dazu Aphiden (*Tubero-lachnus*), welche ihren Wirtspflanzen mittels ihrer Stiletten Saft entziehen. Nachdem die Aphiden von ihren Stiletten abgeschnitten sind, geht der Saftausfluß 24 Stunden weiter. Weatherly, Peel und Hill haben mit dieser Methode bei *Salix* Versuche ausgeführt. Wenn die Zufuhr organischer Stoffe aus den Blättern durch Ringelung der Rinde gestört wird, setzt sich dennoch der Ausfluß des Saftes aus den angeschnittenen Siebröhren während längerer Zeit fort. In den angrenzenden Parenchymzellen wird gespeicherte Stärke in Zucker übergeführt und nach den Siebröhren befördert. Im Lehrbuch von Jost und Benecke findet man, daß transitorische Stärkgebildung und -lösung überall die Zuckerwanderung begleitet, einerlei ob diese in Siebröhren auf weite Entfernungen oder im Parenchym auf kurze Strecken stattfindet. Das stimmt mit einem symplasmatischen Transport des Zuckers.

Einfluß der Plasmaströmung auf den Transport

Wir werden jetzt besprechen, welchen Einfluß die Plasmaströmung auf den Salztransport ausübt.

Bierberg (1909) versuchte die Hypothese von de Vries (1885) zu beweisen, daß Protoplasmaabewegung den Stofftransport beschleunigt. Seine Versuche konnten in meinem Laboratorium durch A. Kok (1932) nicht bestätigt werden. Beweisend waren aber Koks Versuche nicht, da die *Vallisneria*-Blätter im Dunkeln untersucht wurden, wo, wie wir jetzt wissen, die aktive Aufnahme jedenfalls sehr schwach ist. Es ist auch fraglich, ob Versuche mit Lithiumsalzen, welche ziemlich giftig sind, Aufschluß über den Salztransport unter normalen Umständen geben können.

Fitting (1925) und Schweickerdt (1928) haben gefunden, daß ruhendes Cytoplasma durch Belichtung zu strömen anfängt. Aus neuen Versuchen Jagers (1958) geht hervor, daß eine Vorbehandlung mit gewissen Salzen den Einfluß einer Beleuchtung auf die Induktion der Protoplasmaströmung hemmt. Wenn Blätter in einer 1 mM KCl-Lösung während einer Stunde belichtet werden, transportieren sie Chloridionen, während das Plasma keine Strömung zeigt. Es sind die Kalium-, Rubidium- und Calciumionen, welche die Lichtreaktion verhindern. Natrium-, Lithium-, Magnesium-, Strontium-, Lanthan- und Luteokobaltchlorid-Ionen induzieren eine Strömung schon im Dunkeln (Arisz 1956, S. 49). Es scheint, daß damit dieses Problem bei *Vallisneria* gelöst ist in dem Sinne, daß Protoplasmaströmung keine Bedingung ist für den symplasmatischen Transport (Arisz 1956).

Einfluß von Saugspannungen

Saugspannungen verursachen in einer transpirierenden Pflanze Flüssigkeitsströmungen, insbesondere im Xylem und den Zellwänden. Es ist schwierig festzustellen, daß die Stoffwanderung wirklich in den Wänden stattgefunden hat und nicht im angrenzenden Protoplasma, da die Anwesenheit einer Substanz in den Wänden nicht beweist, daß der Transport auch wirk-

lich in der Wand stattgefunden hat und daß die Substanz nicht, nachdem die Wanderung im Symplasma schon beendet war, in den Wänden fixiert wurde (Curtis 1935).

In Wasserpflanzen mit untergetauchten Blättern sind Saugspannungen als Ursache einer Strömung in den Wänden nicht zu erwarten. Der freie Raum bei *Vallisneria*-Blattzellen ist, wie schon besprochen wurde, nur

Tab. 2. *Einfluß einer Verabreichung von Zucker zu der belichteten freien Zone, während die Aufnahmezone verdunkelt ist.*

(Aufnahme aus einer 0.002 M KCl + CaSO₄ Lösung.)

Aufnahme-Zone	Freie Zone	Chlorid-Zunahme in µg	Total
dunkel	licht	103-3	(106)
dunkel	licht + 0,005 mol Sacch.	117-39	(156)
dunkel	licht + 0,020 mol Sacch.	88-17	(105)
dunkel	licht + 0,060 mol Sacch.	74-17	(91)
dunkel	licht + 0,100 mol Sacch.	46-3	(49)

5-7% (K ylin - Winter). Es ist zu erwarten, daß Stoffe, welche in diesem Raum wandern, schnell an die Außenlösung abgegeben werden. Das macht es unwahrscheinlich, daß eine Wanderung im freien Raum, welche durch Saugspannungen verursacht wird, bei diesen Blättern eine Rolle spielt.

Der Einfluß von Saugspannungen auf Aufnahme und Wanderung von Chloriden und Asparagin wurde bei *Vallisneria* in abgeschnittenen Blät-

Tab. 3. *Zucker wird wie in Tabelle 2 der freien Zone verabreicht. Außerdem wird Zucker in verschiedenen Konzentrationen der Aufnahmezone gegeben.*

Aufnahme-Zone	Freie Zone	Chlorid-Zunahme in µg	Total
dunkel	licht	88-3	(91)
dunkel	licht + 0,1 mol Sacch.	17-24	(41)
dunkel + 0,02 mol Sacch.	licht + 0,1 mol Sacch.	38-52	(90)
dunkel + 0,06 mol Sacch.	licht + 0,1 mol Sacch.	52-45	(97)
dunkel + 0,10 mol Sacch.	licht + 0,1 mol Sacch.	95-52	(147)

tern von 7,5 cm Länge untersucht (Arisz-Oudman 1937, 1938, Arisz-Schreuder 1956). Lokale Saugspannungen wurden induziert durch Transpiration des dritten Blattsegmentes in weniger feuchter Luft oder, indem man die dritte Zone in osmotisch wirksame Zuckerlösungen brachte. Eine Verstärkung der Aufnahme und der Wanderung durch die Wasserentziehung in der dritten Zone wurde nicht gefunden. Der Effekt war gerade in entgegengesetztem Sinne, die Aufnahme und Wanderung wurden verringert (Tabelle 2 und 3). Es ist ein osmotischer Effekt, der in der freien Zone entsteht und durch den Symplasten nach der absorbierenden Zone geleitet wird. Wäre der Zucker selber symplastisch nach der absorbierenden Zone gewandert, so würde dort die Aufnahme der Cl-Ionen vergrößert sein (Arisz-Sol). Das bedeutet, daß nicht der Zucker, sondern der osmotische

Effekt der Zuckergabe durch das Symplasma nach der absorbierenden Zone geleitet wird. Der Effekt kann vielleicht als Folge der Dehydratation des Symplasma, besonders der Plasmodesmen gedeutet werden (Arisz-Schreuder) (siehe auch die Besprechung der Münch'schen Druckströmung).

Einfluß von Hemmstoffen auf den Salztransport

Über die Frage, ob der Ionentransport im Symplasma ein vitaler Prozeß ist, geben die Versuche mit Hemmstoffen eine Antwort. Unter vital hat man zu verstehen, daß der Transport mit dem Stoffwechsel zusammenhängt. Wenn man Hemmstoffe wie KCN und Azid in der Absorptionszone verabreicht, besteht die Möglichkeit, daß sie die Aufnahme der

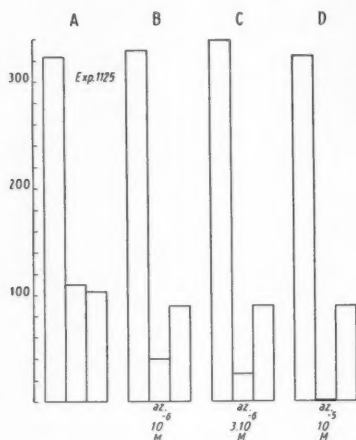


Abb. 15.

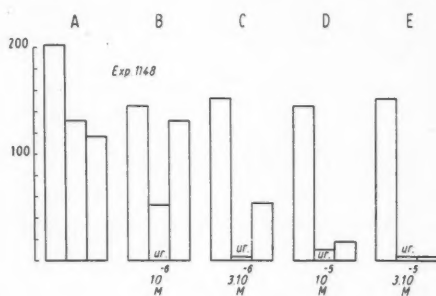


Abb. 16.

Abb. 15. Lokale Hemmung der Chloridsekretion aus dem Plasma bei Verabreichung in der Mittelzone: in B durch Natriumazid 10^{-8} mol, in C durch $3 \cdot 10^{-6}$ mol, in D durch 10^{-5} mol. Die Ionenwanderung nach der dritten Zone wird durch Azid in diesen Konzentrationen nicht gehemmt (Arisz 1958).

Abb. 16. Hemmung der Chloridwanderung durch Uranyl nitrat. Bei den stärkeren Konzentrationen wird nicht nur die Sekretion aus dem Plasma, sondern auch der Transport nach der dritten Zone gehemmt (Arisz 1958).

Ionen in das Symplasma hemmen und dadurch indirekt auch den Transport nach den angrenzenden freien Blattzonen beeinflussen. Man kann in dergleichen Versuchen einen direkten Einfluß nicht von einem indirekten unterscheiden. Wird der Hemmstoff aber in der zweiten Zone verabreicht, dann tritt diese Komplikation nicht auf. Die Aufnahme in das Symplasma wird jetzt nicht beeinflusst. Die Sekretion in die Vakuole und der Transport in dieser Zone können jetzt studiert werden. Ein Einfluß auf die Sekretion wurde gefunden bei Verabreichung von Azid und bei älteren Blättern auch von KCN, Arsenat und Uranyl nitrat. In Abb. 15 wird gezeigt, daß Azid eine starke Hemmung der Sekretion verursacht, aber den Transport nach

der dritten Zone in der benutzten Konzentration nicht beeinflusst. In Abb. 16 hat Uranylнитrat bei der Konzentration 10^{-6} M nur einen lokalen Effekt und gibt eine 50%ige Hemmung der Sekretion, während die Wanderung durch die gehemmte Zone unvermindert fort dauert. Damit auch die Wanderung gehemmt wird, müssen höhere Konzentrationen benutzt werden, als für die Hemmung der Aufnahme in den Symplasten oder der Sekretion in die Vakuole erforderlich sind. Diese höheren Konzentrationen stören möglicherweise den normalen Stoffwechsel und damit die normale Plasmastruktur und machen diese ungeeignet für den Transport. Das würde auf einen Zusammenhang zwischen Transport und Plasmastruktur hinweisen. Jedenfalls ist der Transport weniger empfindlich als die Aufnahme- und die Sekretionsprozesse.

Mechanismus des Transportes

Wir kommen jetzt zur Besprechung des Transportmechanismus. In den Experimenten mit abgeschnittenen *Vallisneria*-Blättern werden fort dauernd Ionen dem Symplasma entzogen, welche meistens in die Vakuole sezerniert werden. Wie schon besprochen ist, können die in den Vakuolen anwesenden Ionen nicht mit Ionen im Plasma ausgetauscht werden. Auch ein passiver Verlust von Salzen aus den Vakuolen konnte bisher bei unbeschädigten Blättern nicht nachgewiesen werden. Die Ionen in den Vakuolen müssen als außer Zirkulation betrachtet werden. Überall im Blatte werden Ionen dem Symplasma entzogen. Dadurch wird die Konzentration im Symplasma erniedrigt und die Ionenzufuhr gefördert. Es gibt einen Wettbewerb zwischen den Sekretionsmechanismen in den verschiedenen Zonen, welche die Ionen aus dem Symplasma zu sezernieren versuchen. Die Stellen, die der Absorptionszone am nächsten sind, fangen mit der Sekretion an. Es dauert mehrere Stunden, bevor eine bedeutende Sekretion in der ersten freien Zone erfolgt (Abb. 17). Für das Verständnis des Transportes bei diesen Blättern ist es wichtig festzuhalten, daß gerade die aus dem Symplasma sezernierten Ionen das Indizium sind, daß ein Transport im Symplasma stattgefunden hat.

Es ist schwierig, über den Transportmechanismus etwas auszusagen, solange wir nicht wissen, ob die Ionen, die im Symplasma transportiert werden, frei sind oder an Träger oder an plasmatische Strukturen gebunden sind. Hier wird ein schärferer Unterschied gemacht zwischen den zwei letztgenannten Bindungsweisen als üblich ist, da es für die Deutung des Transportmechanismus einen großen Unterschied macht, ob die Ionen an

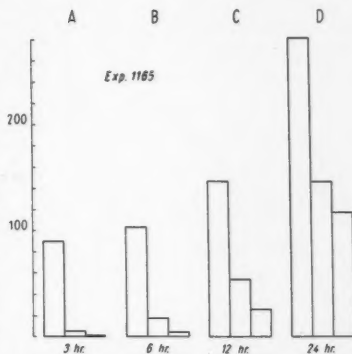


Abb. 17. Chloridaufnahme und Transport nach 3, 6, 12 und 24 Stunden (Arisz 1958).

bewegliche Träger oder an den stationären Symplast gebunden sind. Bei Betrachtung der Aufnahmeprozesse ist dieser Unterschied nicht so wichtig und man kann dann im allgemeinen von der Bildung von Komplexen mit Trägern sprechen. Es ist noch nicht möglich, ein Urteil über diese drei Möglichkeiten zu geben. Es ist wohl klar, daß die Frage, ob beim interzellularen Transport Träger eine Rolle spielen, ganz unabhängig ist von der Rolle eventueller Träger bei der Passage von Membranen bei den Aufnahmeprozessen. Während des Transportes im Symplasma haben die Ionen vielleicht keine Membranen zu passieren. Meines Erachtens weisen die Daten in die Richtung, daß die Ionen nur schwach, vielleicht elektrostatisch, im Plasma gebunden sind, und in solcher Weise, daß sie leicht miteinander ihre Plätze wechseln können. Wären die Ionen festgebunden an Träger, welche im Symplasma wandern, so würde man erwarten, daß diese Komplexe stabil sind und nicht, wie wohl bei der Ionenaufnahme vermutet wird, kurzlebig sind (L a t i e s). Wenn die Ionen aber aus dem Plasma sezerniert werden, müssen die Komplexe zerfallen. Außerdem ist die Wanderungsfähigkeit der Ionen mehr von ihren spezifischen Eigenschaften abhängig als von der Bildung von Komplexen, da Kalium- und Rubidium-Ionen im Plasma wandern, während Calciumionen zumeist festgelegt werden. Die Wanderung der Chloride ist unabhängig von der der Phosphationen, während der Transport des Asparagins unabhängig ist von dem der Salzionen. Das deutet mehr auf Wanderung der Ionen selbst als der Ionen-Träger-Komplexe. Da bei dem Transport An- und Kationen in gleichen Mengen transportiert werden, müssen entweder die Träger sowohl Kat- als Anionen binden oder freie Kat- und Anionen werden in äquivalenten Mengen transportiert.

Spreitung in Grenzflächen

V a n d e n H o n e r t (1932) hat in einem Modellversuch gezeigt, daß an der Grenzfläche zweier Flüssigkeiten (Wasser und Äther) eine schnelle Spreitung stattfindet, wenn eine oberflächenaktive Substanz, wie Kaliumoleat, zugefügt wird. Er besprach, ob die Stoffwanderung in Pflanzen eine Spreitung in einer Grenzfläche sein könnte. Die Anwesenheit und Lokalisierung solcher Grenzschichten im Cytoplasma ist nicht genügend bekannt; der Gedanke ist aber anziehend, da die Geschwindigkeit der Wanderung in Grenzflächen mehr oder weniger in der Größenordnung liegt, die in Geweben für den Transport gefunden wird. Die oben postulierten ununterbrochenen Strukturen im Symplasma scheinen für einen solchen Prozeß geeignet zu sein. Es ist aber notwendig, daß die wandernden Substanzen, wenn sie nicht selber oberflächenaktiv sind, an oberflächenaktive Träger gebunden werden. Wir werden jetzt einige neuere Ergebnisse behandeln, welche zeigen, daß schnelle Stoffwanderungen in der Pflanze stattfinden können.

Schnelle Stoffwanderung

Verschiedene Forscher haben eine schnelle Wanderung gefunden. Von älteren Angaben muß hier genannt werden das Mittelrippenphänomen, das

Strugger bei *Elodea* gefunden hat und das später Bauer (1949, 1953) und Hülsebruch studiert haben. Smelik, der in meinem Institut (1952) arbeitete, hat die Erscheinung als Spreitung an Grenzflächen aufgefaßt. Sie wurde durch oberflächenaktive Stoffe wie Äther und Natriumtaurocholat gehemmt.

Vernon und Aronoff fanden, daß bei der Sojabohne, *Glycine Max*, eine große Anzahl von markierten Stoffen, die bei der Photosynthese in den Blättern aus $C^{14}O_2$ gebildet werden, ziemlich schnell nach der Basis der Pflanzen wandern, Zucker am schnellsten (1,4 cm/min.). Sie nennen zwei Mechanismen, Plasmaströmung und Massentransport, zur Erklärung des Transportes und können auf Grund ihrer Resultate zwischen diesen nicht entscheiden.

Besonders Nelson und Gorham haben eine schnelle Wanderung von Zuckern und Aminosäuren bei Sojabohnen beschrieben. Die Substanzen wurden dem ersten dreiblättrigen Blatte zugeführt oder durch den abgeschnittenen Blattstiel aufgenommen. Sie wurden hauptsächlich in der Richtung nach den Wurzeln transportiert. Interessant ist die auf dem Kongreß in Montreal von Nelson, Perkin und Gorham besprochene schnelle Wanderung von bei der Photosynthese synthetisierten Stoffen, wobei kein künstlicher Eingriff zwecks Einführung der Stoffe erfordert war. Dennoch können bei ihren Versuchen mit transpirierenden Pflanzen durch Wasserverlust Saugströmungen aufgetreten sein. Es würde wichtig sein, dergleichen Versuche ebenso wie bei *Vallisneria* bei vollständiger Verhinderung der Transpiration auszuführen. Vorläufig bleibt es unsicher, ob die schnelle Wanderung im Apoplast, im Symplast oder in beiden stattgefunden hat. Auf plasmatischen Transport weist, daß die Größe der Wanderung durch den Verbrauch, die Benützung und die Festlegung der Stoffe bestimmt wird, so daß Amide wie Asparagin nach anderen Organen wandern als die Aminosäuren. Das bedeutet, daß der Transport einer Substanz durch ihre Benutzung im Stoffwechsel bestimmt wird. Der Transport ist am schnellsten, 1000–1400 cm/ Stunde, bei Asparaginsäure, Serin und Alanin, langsamer, 300–700 cm/ Stunde, bei Asparagin, Harnstoff und Glutaminsäure, während der bei Glycin und Norleucin zwischen diesen Gruppen steht. Die Geschwindigkeit des Transportes der bei der Photosynthese gebildeten Stoffe war 3000 cm/ Stunde (1958), für einzelne Stoffe wurde 2 cm/Sek. gefunden (Nelson, Perkin und Gorham 1959). Bei *Vallisneria* habe ich dergleichen schnelle Transporte bisher nicht gefunden. Wir können das der sofortigen Bindung und der Sekretion der zugeführten Ionen aus dem Symplasma zuschreiben. Nelson und Gorham fanden einen ähnlich schnellen Transport bei Saccharose. Da wir über den Zuckertransport bei *Vallisneria* noch keine Daten zur Verfügung haben, wollen wir hier den Zuckertransport nicht ausführlich behandeln.

Wichtig ist, daß Bennet Clark auf die Möglichkeit gewiesen hat, daß die Passage von Zucker, Wasser und Salzen durch eine Membran stattfinden kann mittels Bildung von Komplexen dieser Substanzen mit Lecithin, welche nach der Membranpassage wieder gespalten werden. Wenn der-

gleichen Komplexe im Plasma eine gewisse Stabilität hätten, würde auch eine Spreitung dieser oberflächenaktiven Komplexe im Symplasma denkbar sein.

Die Deutung der Wanderung derartiger Komplexe als Spreitung ist schwierig wegen des spezifischen Transportes dieser Stoffe und Salze. Aus meinen Versuchen mit *Vallisneria*-Blättern wie aus denen Nelsons und Gorhams mit Sojabohnen geht hervor, daß es schwerlich richtig sein würde, einen Transport einförmiger Komplexe anzunehmen. Wenn die Salze und die Aminosäuren ohne die Hilfe von Trägern im Symplasma transportiert werden, ist der spezifische Transport und die Regulation, welche auf der Bindung der transportierten Substanzen im Stoffwechsel beruht, besser zu verstehen.

Osmotische Massenströmungen

Es ist das Verdienst Münchs, darauf hingewiesen zu haben, daß im Parenchymgewebe die Bildung von osmotisch wirksamen Stoffen im Plasma einer Zelle eine osmotische Strömung nach den angrenzenden Zellen verursacht. Dabei wird vorausgesetzt, daß das Symplasma von einer semipermeablen Membran umgeben ist und daß auch die Vakuolenmembran semipermeabel ist. Mittels dieser Druckströmung wird durch das Plasma und die Plasmodesmen eine Lösung von der einen Zelle zur nächsten befördert. Diese hydraulischen Druckströmungen finden nach Münch über große Strecken mit großer Geschwindigkeit statt. Die theoretisch richtige Hypothese hat nur wenig Interesse erregt, da die allgemeine Auffassung war, daß das Parenchymgewebe für den Transport nur geringe Bedeutung hat.

Die Münchsche Theorie über den symplastischen Transport in den Parenchymzellen verdient gründliche Erwägung. Auch wenn seine Auffassung über den Druckstrom richtig ist, bedarf sie jedenfalls einer Ergänzung, da die aktive Aufnahme in das Symplasma und die Sekretion aus dem Symplasma ihm noch gänzlich unbekannt waren.

Viel mehr Aufmerksamkeit, aber auch Widerspruch hat seine Hypothese über Massentransport in den Siebröhren geweckt. Nach seiner Auffassung ist bei Siebröhren die Vakuolenhaut permeabel und die Stoffe wandern in den Vakuolen, welche in offener Verbindung miteinander stehen, da die Plasmodesmen in den Siebfeldern offene Schläuche bilden.

Wir haben also einen Druckstrom im Symplasma von einem Druckstrom in den Vakuolen zu unterscheiden. Für beide ist typisch, daß es ein Massentransport ist, wobei Wasser mit darin gelösten Stoffen transportiert wird. Wir legen uns darum die Frage vor, ob bei *Vallisneria* Andeutungen über Massentransport gefunden wurden. Die Ergebnisse über gleichzeitigen Transport von Kaliumchlorid und Asparagin in entgegengesetzten Richtungen sind damit völlig im Widerspruch, da dieser Transport symplastisch ist und die Stoffe unabhängig voneinander transportiert werden.

Arisz und Sol haben, wie schon beim Einfluß von Saugspannungen besprochen ist, Versuche angestellt über den Einfluß einer Verabreichung von Zucker in verschiedenen Zonen eines transportierenden Blattstückes. Sie fanden, daß die Zugabe von Zucker in der Absorptionszone die Salzauf-

nahme und die Akkumulation in den Blattzellen erhöht. Auch der Chloridtransport wird vergrößert.

Wenn Zucker in der Aufnahmezone in das Plasma aufgenommen ist, wird das nach Münch einen osmotischen Druckstrom verursachen, welcher den Chloridtransport verstärkt. Die Erhöhung des Transportes kann aber nicht die Folge einer osmotischen Druckströmung sein, denn der Transport wird, wenn der Zucker auch den freien Zonen verabreicht wird, noch stärker erhöht. Der Zucker wirkt hier also mittels des Stoffwechsels.

Wird aber der Zucker nur im freien Teil verabreicht und nicht in der Aufnahmezone, so wird die Aufnahme von KCl in der Absorptionszone und auch der Transport stark gehemmt. Hier sind zwei Erklärungen möglich.

Der Zucker kann, wenn er nicht aufgenommen wird, dem Gewebe osmotisch Wasser entziehen.

Arisz und Schreuder haben diesen Einfluß als eine osmotische Wasserentziehung aus dem Symplasma gedeutet, die aus der freien Zone nach der Aufnahmezone fortgeleitet wird. Diese Erklärung beruht auf der Erscheinung, daß Wasserverlust infolge Transpiration der freien Zone denselben Effekt zustande bringt.

Man kann sich aber auch vorstellen, daß der Zucker in der freien Zone in das Plasma aufgenommen wird und einen Druckstrom verursacht, welcher in einer dem Chloridtransport entgegengesetzten Richtung erfolgt. Auch in dieser Weise ist die Abnahme des Chloridtransportes zu erklären.

Wird aber der Zucker in die Vakuole sezerniert, so ist kein Druckstrom zu erwarten. Es bleibt natürlich möglich, daß der Zucker auf verschiedene Weise zu gleicher Zeit wirkt und daß der eine Prozeß stärker ist als der andere. Es ist merkwürdig, daß Arisz und Sol auch bei Belichtung der freien Zone ähnliche Effekte gefunden haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bisher bei *Vallisneria* nicht mit Sicherheit festgestellt ist, daß Druckströme beim Chloridtransport eine Rolle spielen.

Anwesenheit einer äußeren Plasmamembran und eines freien plasmatischen Raumes

Wenn man das Plasma teilweise als freien Raum betrachtet, jedenfalls keine äußere semipermeable Plasmamembran anerkennt, sind die Bedingungen für osmotische Druckströmung im Plasma nicht gegeben. Es scheint also, daß das Vorkommen einer Druckströmung einen Beweis liefern kann für die Anwesenheit einer peripheren semipermeablen Membran. Bisher hat man, soweit mir bekannt ist, dergleichen osmotische Strömungen im Plasma nicht festgestellt.

In unseren Experimenten mit *Vallisneria* haben wir Gründe erhalten für die Anwesenheit einer äußeren Plasmamembran. Die Permeabilität der äußeren Membran hat man nur selten bestimmt, da man bei früheren Untersuchungen meistens das System, Plasma zusammen mit Plasmalemma und Tonoplast, also die Transmeabilität (Arisz 1945) untersucht hat. In der letzten Zeit hat Dainty das Problem der Membranpermeabilität von

neuem untersucht. Dainty und MacRobbie finden u. a. bei *Nitellopsis* die Außenmembran durchlässiger als den Tonoplasten. Wir fanden bei *Vallisneria*, daß die Aufnahme in das Symplasma ein vom Stoffwechsel abhängiger Prozeß ist, der durch Enzymgifte gehemmt wird, was darauf hinweist, daß bei der Ionenaufnahme eine Barriere passiert werden muß. Sol hat den Einfluß einer Vorbehandlung mit Salzen auf die Chloridaufnahme studiert. Er fand, daß nur Salze, die während der Vorbehandlung im Lichte in das Plasma aktiv aufgenommen waren, die spätere Chloridaufnahme beeinflussen. Der Salzeinfluß ist ebensowohl von der Art des Kations als des Anions abhängig. Wie schon auf Seite 310 gesagt ist, weist das auf die Bindung der Salzionen an Strukturen des Protoplasmas hin.

Das Ergebnis der Versuche Jagers, daß die Kationen Kalium, Rubidium und Calcium unabhängig von den anwesenden Anionen auf das Auftreten der Protoplasmaströmung bei Belichtung Einfluß haben, weist vielleicht in der Richtung, daß die Kationen in das Plasma eindringen bis zu den an der Plasmaströmung sich beteiligenden Partikeln. Das könnte als Kationentausch gedeutet werden, welcher durch eine für Kationen permeable Plasmamembran ermöglicht wird, ist immerhin noch unsicher.

In dieser Weise waren wir zur Vorstellung gekommen (Arisz 1954), daß das periphere Plasma sich wie eine Membran verhält, die für Kationen permeabel ist, aber durch Anionen nur unter Energieverbrauch passiert werden kann. Da das Plasma eine große Permeabilität für lipoidlösliche Stoffe besitzt, werden auch lipoide Stoffe in der Membran anwesend sein müssen und wie Höfler (1959) angegeben hat, lipoide Bahnen im Plasma herstellen. Das gibt das Bild einer Mosaikstruktur. Elektronenmikroskopisch hat man im Zellplasma viele Membranen gefunden und es ist bisher unbekannt, ob das endoplasmatische Retikulum oder andere Plasmastrukturen bei den Aufnahme- und Transportprozessen eine besondere Rolle spielen (Kahn und Hanson 1959). Eine Identifizierung der auf Grund physiologischer Resultate postulierten Membranen mit in der Zelle sichtbaren Strukturen war bisher noch nicht möglich. Daher ist über die Bedeutung des freien Raumes für diese Prozesse wenig zu sagen. Wir wissen nur, daß bei *Vallisneria* der freie plasmatische Raum nicht besonders groß ist. Der totale freie Raum beträgt, wie schon besprochen ist, maximal 6 bis 7 Prozent (Kylin, Winter).

Transport durch das Phloem

Es bleibt noch die Frage zu behandeln, welche Bedeutung die Ionenwanderung in Parenchymzellen für den Transport über größere Strecken hat, wobei insbesondere an Siebröhrentransport gedacht wird. Der Erfolg unserer Versuche mit abgeschnittenen *Vallisneria*-Blättern ist die Feststellung, daß der Transport symplasmatischer Art ist. Wir haben in den 7,5 cm langen Blattstücken ein System zur Verfügung, womit auf einfache Weise quantitative Daten über den Einfluß innerer und äußerer Umstände auf den Transport erhalten werden können, während operative Versuche mit Brücken wertvolle Angaben über die Transportbahnen ans Licht gebracht haben.

Aus den Versuchen mit intakten Pflanzen haben wir den Eindruck bekommen, daß sie diese Resultate stützen. Die Wanderung der Salze findet ebensowohl in Leitbündeln wie in Parenchymzellen statt. Sie gehören beide zum Symplasma.

Bisher haben wir bei *Vallisneria* noch keine Ergebnisse erhalten über den Transport von nichtpolaren organischen Stoffen wie Zucker. Es wurde schon erwähnt, daß bei anderen Pflanzen auch der Zuckertransport zu gleicher Zeit in Siebröhren und in Parenchymzellen stattfindet, wenigstens daß immer ein Gleichgewicht zwischen beiden sich einstellt, wodurch die in den

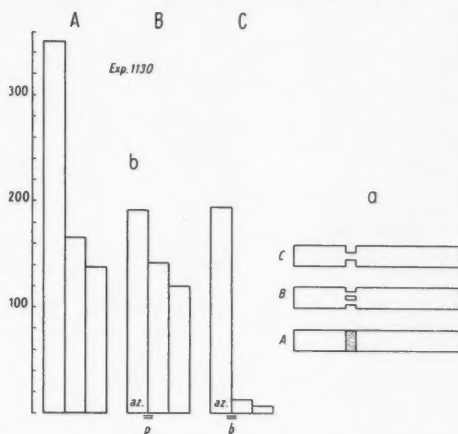


Abb. 18.

Abb. 18 a. Bei den Blattstücken ist bei A die Operationszone intakt und nicht mit-analysiert. Bei B zwei Parenchymbrücken, bei C eine Leitbündelbrücke.

Abb. 18 b. Azid ist in B und C bei der Absorptionszone verabreicht und hemmt den Transport nur, wenn eine Bündelbrücke anwesend ist. Der Transport durch Parenchymbrücken wird nicht gehemmt (Arisz 1958).

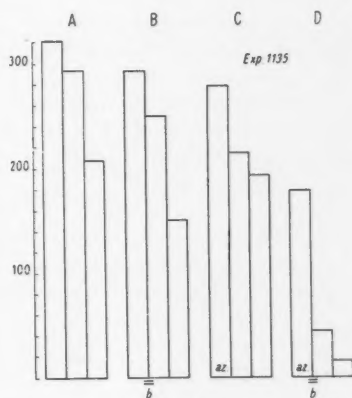


Abb. 19.

Abb. 19. Aufnahme und Transport von KCl. B zeigt den Einfluß einer Leitbündelbrücke auf den normalen Transport. In C und D ist Natriumazid der Absorptionszone verabreicht. Eine Brücke ohne Leitbündel hemmt den Transport fast gar nicht. Ist ein Leitbündel anwesend, so wird die Chloridwanderung nach den freien Zonen beträchtlich gehemmt (Arisz 1958).

Siebröhren geleiteten Stoffe auch in das Plasma der Parenchymzellen gelangen, während bei starker Zuckerabfuhr durch die Siebröhren auch Zucker aus den Parenchymzellen bezogen wird, unter gleichzeitiger Lösung der Stärke. Wir haben besprochen, daß eine Regulation dieser Stoffwanderung durch das Konzentrationsgefälle stattfindet und daß auch die aktive Aufnahme in das Symplasma nebst Speicherungs- und Sekretionsprozessen dabei eine Rolle spielt. Nur eine Ausnahme wurde gefunden (Abb. 18 und 19). Azid, zugeführt zu der absorbierenden Zone, hemmt die Wanderung durch Bündelbrücken, hat aber keinen Einfluß auf den Transport durch Parenchymbrücken. Azid muß folglich einen Prozeß hemmen, der beim Transport

durch die Siebröhren eine Rolle spielt. Da dieser Einfluß von Azid nicht bei allen untersuchten Blättern gefunden wurde (Arisz 1958), besteht die Möglichkeit, daß diese Reaktion mit der Differenzierung der Siebröhren zusammenhängt. Wie diese nicht ionisierten Stoffe in den Siebröhren transportiert werden, bleibt hier unbesprochen. In unseren Versuchen haben wir keinen Massentransport des Inhalts der Siebröhren gefunden. Das kann dadurch verursacht sein, daß der Transportmechanismus bei den benutzten jungen Siebröhren weniger spezialisiert ist als bei den älteren. Es kann auch sein, daß die äußeren Umstände hierbei eine Rolle spielen, besonders die Konzentration, die in unseren Versuchen wahrscheinlich auch in den Siebröhren sehr niedrig war. Wir haben schon früher besprochen (Arisz 1952), daß man nicht erwarten kann, daß die Siebröhren die Stoffe nur auf eine Weise leiten. Die älteren Siebröhren mit degenerierten Kernen und Tonoplasten werden auf andere Weise transportieren müssen als junge Siebröhren, die, obwohl schon in gewissem Grade spezialisiert, dennoch einen symplastischen Transport zeigen.

Besprechung einiger Resultate

Wir haben uns bei der Besprechung des Transportes hauptsächlich auf die bei *Vallisneria* erhaltenen Ergebnissen beschränkt. Besonders das nach dem Abschluß des Manuskriptes erschienene Handbuch über Pflanzenphysiologie, herausgegeben von Steward (Teil II, Plants in relations to water and solutes) gibt wertvolle Zusammenfassungen der einschlägigen Literatur.

Die Bedeutung, die man den bei *Vallisneria* erhaltenen Resultaten zuerkennen will, ist abhängig von der Frage, ob *Vallisneria* eine Ausnahme im Pflanzenreich bildet oder ein allgemeingültiges Bild dieser Prozesse bietet, welches desto reiner hervorkommt, weil bei *Vallisneria* als submerser Wasserpflanze Saugspannungen und Wasserströmungen in den Geweben die Stoffleitung weniger beeinflussen können. Gefunden ist, daß in *Vallisneria*-Blättern die Salze symplastisch fortgeleitet werden und daß neben den Parenchymzellen auch das Phloem in den Bündeln dazu gehört. Während man bisher sich besonders für den Transport in Siebröhren interessiert hat, sind wir durch unsere Ergebnisse zu der Auffassung gekommen, daß die Stoffleitung eine allgemeine protoplasmatische Eigenschaft sein muß und daß man versuchen muß, den Transport in Siebröhren hieraus abzuleiten als Folge einer weiteren Spezialisierung dieser Leitungsbahnen.

Als mögliche Transportmechanismen sind zu besprechen:

- I. Osmotische Druckströmung: A. im Symplasma der Parenchymzellen (Münch). B. in den Vakuolen der Siebröhren, welche durch offene Kanäle mit einander verbunden sind (Münch).
- II. Aktivierete Diffusion (Mason und Maskell).
- III. Beschleunigte Stoffwanderung im Symplasma: A. Protoplasmaströmung (H. de Vries). B. Spreitung in Grenzflächen (van den Honert). C. Erleichterte Diffusion im Symplasma.

Wir haben gesehen, daß bisher bei *Vallisneria* keine osmotische Druckströmung im parenchymatischen Gewebe gefunden wurde. Für die hier besprochene Salzwanderung scheint sie keine Rolle zu spielen.

Der zweite Mechanismus ist bisher nicht viel bearbeitet. Man versteht unter aktivierter Diffusion, daß die Wanderung durch Benutzung freier Energie aus dem Stoffwechsel schneller verläuft als eine Diffusion. Ein solcher Prozeß scheint mir ziemlich unwahrscheinlich, wenn man sieht, daß die Ionenwanderung für Hemmstoffe viel weniger empfindlich ist als die Aufnahme und die Akkumulation der Ionen in den Zellen. Wir haben keinen Grund, eine derartige aktive Ionenwanderung bei *Vallisneria* anzunehmen.

So bleibt noch die Möglichkeit eines Spreitungsprozesses übrig. Man denkt dabei an Spreitung oberflächenaktiver Stoffe in Grenzflächen. Wir bedürfen eigentlich eines Prozesses, wobei Ionen in dem Plasma leicht wandern können.

Im Gegensatz zu der aktivierten Diffusion wollen wir hier von einer erleichterten Diffusion der Ionen sprechen, welche keiner Stoffwechselenergie bedarf und wie bei Spreitung oberflächenaktiver Substanzen durch die Struktur des plasmatischen Systems mit orientierten Makromolekülen ermöglicht wird. In den plasmatischen Donnan-Systemen sind die Ionen nicht chemisch fixiert, sondern durch elektrostatische Kräfte an die Makromoleküle gebunden, wobei ein kontinuierlicher Umtausch der Ionen stattfindet. Werden irgendwo diesem System Ionen entzogen, so erfolgt eine gerichtete Ionenwanderung. Wir wissen über die Strukturen in den neu entdeckten Plasmaorganellen wie in dem endoplasmatischen Retikulum noch so wenig, daß wir noch nicht entscheiden können, in welchen Systemen dergleichen Ionenwanderungen stattfinden können.

Von den übrigen besprochenen Punkten wollen wir hier nur noch einen erwähnen. Die Untersuchungen mit markierten Ionen haben interessante Resultate geliefert über die Frage, ob die absorbierten Ionen sich unmittelbar am Transport beteiligen oder gerade durch ihre Aufnahme ins Plasma den Transport ähnlicher dort anwesender Ionen verursachen. Wir haben die Frage gestellt, ob es ein Ionen„pool“ im Plasma gibt, so daß die markierten Ionen in einen „pool“ gelangen, wo bereits identische nicht markierte Ionen vorhanden sind, während ein Gemisch markierter und nicht markierter Ionen aus dem „pool“ weiter transportiert wird. Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen. Sie haben aber gezeigt, daß in bestimmten Fällen die absorbierten markierten Ionen größtenteils in der Absorptionszone bleiben und nur wenig markierte Ionen zusammen mit den schon anwesenden nicht markierten Ionen transportiert werden. Die Proportionen sind natürlich abhängig von der Größe des Ionen„pool“, der Transportzeit und der Transportgeschwindigkeit.

Aus diesen Resultaten folgern wir, daß es nicht richtig ist zu sagen, daß man durch die Benutzung markierter Stoffe bei Transportversuchen die transportierten Substanzen von den gewöhnlichen Zellkomponenten unterscheiden kann. Es ist möglich, daß nur ein Teil der markierten Ionen

an dem Transport teilnimmt. Welcher Art die Ionen sind, die sich am Transport beteiligen, kann in gewissen Fällen festgestellt werden durch chemische Bestimmung der transportierten Ionen neben der Bestimmung der markierten Ionen.

Meinem Nachfolger, Dr. M. H. van Raalte, danke ich herzlich für die Bereitstellung der Hilfsmittel des botanischen Laboratoriums nach meinem Rücktritt, Herrn Dr. R. J. Helder für technische Hilfe bei dem Arbeiten mit markierten Salzen und den Laboranten für ihre unentbehrliche Mitwirkung. Herr Prof. Dr. M. Gruber war so liebenswürdig, das Manuskript zu lesen und die biochemischen Probleme mit mir zu besprechen, wofür ich ihm sehr erkenntlich bin.

Literatur

- Arisz, W. H., 1945: Contribution to a theory on the absorption of salts by the plant and their transport in parenchymatous tissue. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. 48.
- 1952: Transport of organic compounds. Annual Rev. Plant Physiol. 3.
- 1954: Transport of chloride in the Symplasm of *Vallisneria* leaves. Nature 174.
- 1954: Permeability in plants. Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 3.
- 1956: Significance of the symplasm theory for transport across the root. Protoplasma 46.
- 1958: Influence of inhibitors on the uptake and the transport of chloride ions in leaves of *Vallisneria spiralis*. Acta Bot. Neerlandica 7.
- 1959: Observations on translocation in parenchyma and their significance for long distance translocation. Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.
- 1959: Symplasm theory of salt uptake and transport in parenchymatic tissue. Abstr. Intern. Botanical Congress, Montreal.
- 1960: Translocation of salts in *Vallisneria* leaves. Bulletin Research Council, Israel 8 D.
- and M. J. Schreuder, 1956: The path of salt transport in *Vallisneria* leaves. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet., Ser. C, 59.
- and M. J. Schreuder, 1956: Influence of water withdrawal through transpiration on the salt transport in *Vallisneria* leaves. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet., Ser. C, 59.
- and H. H. Sol, 1956: Influence of light and sucrose on the uptake and transport of chloride in *Vallisneria* leaves. Acta Bot. Neerlandica 5.
- Bauer, L., 1953: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta 42.
- Bennet Clark, T. A., 1956: Salt accumulation and mode of action of auxin. A preliminary hypothesis. London, Butterworths scientific publications. Wain and Wightmann, The chemistry and model of action of plant growth substances.
- Benecke, V., and L. Jost, 1924: Pflanzenphysiologie, Band I. Stoffwechsel. G. Fischer, Jena.
- Bierberg, W., 1909: Die Bedeutung der Plasmarotation für den Stofftransport. Flora 99.
- Briggs, G. E., and R. N. Robertson, 1957: Apparent free space. Ann. Rev. Plant Physiol. 8.
- A. B. Hope, and M. G. Pitman, 1958: Exchangeable ions in beet disks at low temperature. J. Exper. Bot. 9.

- Broyer, T. C., 1950: Further observations on the absorption and translocation of inorganic solutes using radioactive isotopes with plants. *Plant Physiol.* 25.
- Crafts, A. S., 1959: Further studies on comparative mobility of labelled herbicides. *Plant Physiol.* 34.
- Curtis, O. F., 1955: The translocation of solutes in plants. New York and London, McGraw-Hill.
- Dainty, J., 1959: The ion transport in large single cells of Characeae. Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.
- Epstein, E., 1955: Passive permeation and active transport of ions in plant roots. *Plant Physiol.* 30.
- 1956: Mineral nutrition of plants. Mechanisms of uptake and transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7.
- 1959: The variety of ion transport mechanisms. Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.
- and C. E. Hagen, 1952: A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiol.* 27.
- and J. E. Leggett, 1954: The absorption of alkaline earth cations by barley roots. Kinetics and mechanism. *Am. J. Bot.* 41.
- Fischer, H., 1958: Der Transport der Mineralstoffe. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 4. Springer Verlag, Berlin.
- Fitting, H., 1925: Untersuchungen über die Auslösung von Protoplasmaströmung. *Jb. wiss. Bot.* 23.
- Helder, R. J., 1957: The influence of pretreating young barley plants with water and various solutions on subsequent absorption of labelled rubidium. *Proc. Kon. Nederl. Akad. Wet., Amsterdam*, Series C, 60.
- 1958: Studies on the absorption, distribution and release of labelled rubidium ions in young intact barley plants. *Acta Bot. Neerlandica* 7.
- 1959: Importance of cytoplasm conditioning by ionic composition of the medium on absorption capacity. Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.
- Higinbotham, N., 1959: The possible role of adenosine triphosphate in rubidium absorption as revealed by the influence of external phosphate, dinitrophenol and arsenate. *Plant Physiol.* 34.
- Höfler, K., 1953: Zur Kenntnis der Plasmahautschichten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 65, 391.
- 1959: Permeabilität und Plasmabau. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 72, 236.
- Honert, T. H., van den, 1932: On the mechanism of the transport of organic materials in plants. *Proc. Kon. Akad. Wet., Amsterdam* 55.
- Huber, B., 1956: Die Saftströme der Pflanzen. Springer Verlag, Berlin.
- Hülsbruch, M., 1944: Fluoreszenzoptische Untersuchungen über den Wasserweg in der Wurzel. *Planta* 34.
- 1954: Zum extrafaskikulären Wasserweg in der Wurzel. *Planta* 43.
- 1956: Die Wasserleitung in Parenchymen. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. III. Springer-Verlag, Berlin.
- Jacobson, L., R. Overstreet, R. Carlson, J. Chastain, 1957: The effect of pH and temperature on the absorption of potassium and bromide by barley roots. *Plant Physiol.* 32.
- J. Hannapel, and D. P. Moore, 1958: Non metabolic uptake of ions by barley roots. *Plant Physiol.* 33.
- Jäger, G., 1958: The influence of salts on protoplasmic streaming generated by light in subepidermal cells of *Vallisneria* leaves. *Acta Bot. Neerlandica* 7.

- Jenny, H., and R. Overstreet, 1939: Surface migration of ions and contact exchange. *J. Phys. Chem.* 43.
- Kahn, J. S., and J. B. Hanson, 1959: Some observations on potassium accumulation in corn root mitochondria. *Plant Physiol.* 34.
- Kok, A. C. A., 1935: Über den Transport körperfremder Stoffe durch parenchymatisches Gewebe. *Rec. trav. bot. néerl.* 30.
- Kramer, P. J., 1959: Radial movement of salts in roots. *Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.*
- Kylin, A., 1957: The apparent free space of *Vallisneria* leaves. *Physiologia Plantarum* 10, 732—740.
- Laties, G. G., 1959: The generation of latent ion transport capacity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 45.
- 1959: Active transport of salts into plant tissue. *Annual Rev. Plant Physiol.* 10.
- Lookeren Campagne, R. N. van, 1957: Light dependent chloride absorption in *Vallisneria* leaves. *Acta Bot. Neerlandica* 6.
- MacRobbie, E. A. C., and J. Dainty, 1958: Sodium and potassium distribution and transport in the sea weed *Rhodomenia palmata* (L.). *Physiologia plantarum* 11.
- 1958: Ion transport in *Nitellopsis obtusa*. *J. Gen. Physiol. (Am.)* 42.
- Middleton, L. J., and R. Scott Russell, 1958: The interaction of cations in absorption by plant tissues. *J. exper. Bot.* 9.
- Mittler, T. E., 1959: Aphids and their supply of sieve-tube sap. *Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.*
- Münch, E., 1930: *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Gustav Fischer, Jena.
- Nelson, C. D., and P. R. Gorham, 1957: Translocation of radioactive sugars in the stems of soybean seedlings. *Canad. J. Bot.* 35.
- 1957: Uptake and translocation of C^{14} labelled sugars applied to primary leaves of soybean seedlings. *Can. J. Bot.* 35.
- 1958: Translocation of C^{14} aminoacids and amides in young soybean plants. *Proc. Plant Physiol. Meetings. Plant Physiology* 33, Suppl.
- 1959: Translocation of C^{14} labelled aminoacids and amides in the stems of young soybean plants. *Canad. J. Bot.* 37.
- H. J. Perkins, and P. R. Gorham, 1958: Note on a rapid translocation of photosynthetically assimilated C^{14} out of the primary leaf of the young soybean plant. *Can. J. of Biochem. and Physiol.* 36, 1959. *Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.*
- Overstreet, R., 1957: Comments on the absorption of inorganic ions by root cells. *Plant Physiol.* 32.
- 1959: On the nature of ion carriers in mineral absorption by plants. *Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.*
- Robertson, R. N., 1959: Cell wall membranes and cytoplasmic particles in absorption. *Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal.*
- Russell, R. Scott, 1954: The relationship between metabolism and the accumulation of ions by plants. *Symp. Soc. exper. Biol.* 8, Cambridge Univ. Press.
- Schweickerdt, H., 1928: Untersuchungen über Photodinese bei *Vallisneria spiralis*. *Jb. wiss. Bot.* 68.
- Smelik, nicht publiziert.
- Sol, H. H., 1958: Pretreatment and chloride uptake in *Vallisneria* leaves. *Acta Bot. Neerlandica* 7.
- Solender, H., 1913: Systematisch-anatomische Untersuchung des Blattes der Hydrocharitaceen. *Beih. bot. Cbl.* 30, 1.

- Strugger, S., 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora* 132.
- Sutcliffe, J. F., 1959: Salt uptake in plants. *Biol. Rev.* 34.
- and R. G. Hurd, 1959: Active absorption of bicarbonate ions by vacuolated plant cells. *Abstr. Intern. Botan. Congress, Montreal*.
- Vernon, L. P., and S. Aronoff, 1952: Metabolism of soybean leaves. IV. Translocation from soybean leaves. *Arch. Biochem. Biophysics* 36.
- Vries, H. de, 1885: Über die Bedeutung der Zirkulation und der Rotation des Protoplasma für den Stofftransport in der Pflanze. *Bot. Ztg.* 43.
- Weatherly, P. E., A. J. Peel, and G. P. Hill, 1959: The physiology of the sieve tube. *J. Exp. Bot.* 10.
- Winter, H., nicht publiziert.

Uranin-Fluorochromierung von *Allium*-Zellen nach Vorbehandlung mit Ammonkarbonat

Von

Franz Enöckl

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1959)

Inhalt

1. Einleitung	344
2. Die Wirkung des Ammonkarbonat auf die <i>Allium</i> -Zellen	346
a) Kernveränderungen	347
b) Plasmaveränderungen	348
3. Verminderung der Tingierbarkeit durch Vorbehandlung der Schnitte mit Ammonkarbonat	353
a) Durchsaugversuche	353
b) Kurzversuche	356
c) Weitere Beobachtungen an fluorochromierten nekrotischen und toten Zellen	358
4. Zum Phänomen der Umlagerung	360
5. Zusammenfassung	371
Literatur	372

1. Einleitung

Die Fluoreszeine fanden als ausgesprochene Plasmafarbstoffe auf dem Gebiete der Botanik schon vielfach Verwendung. Schumacher (1933, 1936, 1937), Rouschal (1941) und Bauer (1949, 1953) versuchten mit Hilfe der Fluorochromierung die Mechanik der Assimilatleitung zu klären. Reinzellphysiologische Fragestellungen liegen dagegen den Arbeiten Döring (1935), Strugger (1938) und Höfler, Ziegler und Luhan (1956) zugrunde, in denen auf dem Weg der Tingierung tiefere Einsicht in den Bau und die physiologischen Leistungen des Plasmas zu gewinnen erstrebt wird.

Nachdem Döring betont hatte, daß der Farbstoff entsprechend seiner sauren Natur im Einklang mit der Betheschen Regel aus saurem Medium gut

aufgenommen wird, stellten in Reihenversuchen mit Farblösungen von verschiedenem pH Strugger für das K-Fluoreszein und Höfler, Ziegler und Luhan für das entsprechende Na-Salz übereinstimmend fest, daß die Tingierung um pH 4,8 am kräftigsten ausfällt. Von allen Autoren wird auf die große Speicherfähigkeit des Plasmas verwiesen, die weit über die Konzentration der Farblösung hinausgeht.

Nachdem bereits aus Arbeiten auf zoologischem Gebiet bekannt war, daß nur lebendes Plasma Fluoreszeine zu speichern vermag, wurde dies auch in der botanischen Vitalfärbung vielfach bestätigt. Schumacher (1936, S. 511) und Höfler, Ziegler und Luhan (S. 326) beobachteten an tingierten Zellen, daß sowohl beim natürlichen als auch beim experimentell herbeigeführten Zelltod der Farbstoff vom Plasma abgestoßen wird. Doch nicht jedes tote Plasma bleibt in der Fluoreszenz völlig unsichtbar. So konnten letztgenannte Autoren auch an totem *Trianea*-Plasma matte, gelblich-grüne Fluoreszenz feststellen, die aber deutlich unterschieden war vom blaugrünen Leuchten des lebenden Plasmas, so daß grelle Fluoreszenz als Beweis für die Vitalität angesehen werden darf.

Döring beobachtete als erster, daß gequollenes Plasma Uranin besonders stark zu speichern vermag, gleichgültig ob das Plasma bei wundreizbedingter Vakuolenkontraktion oder bei Plasmolyse mit K-Salzen zur Aufquellung veranlaßt wurde. Dasselbe Verhalten fanden auch Höfler, Ziegler und Luhan bei jener Vakuolenkontraktion, die durch Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen ausgelöst worden war. Auch bei Doppel-färbung mit Rhodamin B und Uranin zeigte sich das stärkere Speichervermögen der Zellen mit Vakuolenkontraktion besonders schön. Während die Uraninfluoreszenz unverquollenen Plasmas im UV-Licht von der goldbraunen Farbe des Rhodamin überdeckt war, dominierte sie in den Randzellen mit Vakuolenkontraktion.

Höfler, Ziegler und Luhan konnten auch dartun, daß bezüglich der Speicherfähigkeit bei verschiedenen Pflanzen plasmatische Unterschiede bestehen. Während in den Stengelparenchymzellen von *Tradescantia elongata* das Plasma völlig fluoreszenzfrei blieb, zeigte sich in den Wurzelhaaren von *Trianea Bogotensis* eine rasch strömende, nicht leuchtende und eine von dieser passiv mitgeführte, lebhafter fluoreszierende Phase. Auch das Rotalgenplasma galt nach Untersuchungen von Höfler und Düvel (1954) und Höfler, Url und Diskus (1956) für das Uranin als speicherunfähig, doch soll hier nach unveröffentlichten Ergebnissen Höflers unter bestimmten Voraussetzungen eine Färbung möglich sein.

Strugger konnte in seinen Studien über die Einwanderung des K-Fluoreszein aus farbstoffgetränkten Gelatineklötzchen in *Helodea*-Blättchen zeigen, daß die jungen, meristematischen Zellen der Streckungszone den Farbstoff sofort im Plasma speichern, während dieser in der Dauerzone eine Strecke weit die Zellwände imbibiert und erst von hier langsam in das Plasma aufgenommen wird. Ein dem Auflegen des Farbstoffgels vorausgehendes Bad der Blättchen in saurem Puffer vom pH 2–4,6 bewirkte nun auch in der Dauerzone sofortige Plasmatisierung. Strugger meint nun, daß der Farbstoff um so rascher vom Plasma adsorptiv gespeichert wird,

je saurer die Reaktion des Plasmas ist. Demgegenüber darf man wohl annehmen, daß vielmehr das pH der Imbibitionsflüssigkeit der Zellwände und damit das Vorliegen von Ionen oder permeierfähigen Molekülen des Farbstoffes für die Speicherung entscheidend ist. Gegen die Auffassung Struggers, daß die Bindung des Farbstoffes ans Plasma eine reine Elektroadsorption der Farbionen an positiv geladene Plasmaflächen darstelle, wenden sich Höfler, Ziegler und Luhan (S. 328) mit dem Hinweis auf die verstärkte Speicherung bei Kappenplasmolyse, ausgelöst durch KCl. Da es gesichert ist, daß das KCl, wie aus der morphologischen Kernveränderung (Strugger 1932, Höfler 1954, Bancher 1958) hervorgeht, intrameiert und hier in osmotisch frei disponiblen Wasser (vergl. Huber und Höfler 1930, S. 424) sicher zum Großteil ionisiert vorliegt, müßten demnach die wie der Farbstoff negativ geladenen Cl-Ionen eine Färbung unterbinden; da dies aber nicht der Fall, sondern die Speicherung verstärkt ist, wird eine Elektroadsorption negiert.

Höfler, Ziegler und Luhan prüften auch die Uraninfärbbarkeit gequollenen Plasmas bei jener Vakuolenkontraktion, wie sie nach Scheidl (1954) mit unschädlichen Ammoniak- und Ammonkarbonatlösungen zu erzielen ist. Dabei machten sie die Feststellung, daß nur wundrandnahe Zellen grelle Fluoreszenz zeigten, während die intakten Flächenzellen keine oder fast keine Uraninspeicherung erkennen ließen.

Ein Hauptziel vorliegender Arbeit bestand nun darin, die Verminderung der Speicherkapazität des Plasmas für Uranin durch Vorbehandlung mit Ammonkarbonatlösung, die ja infolge von Hydrolyse freies NH_3 enthält, an *Allium*-Zellen zu untersuchen. Weiteres Ziel wäre, zur wichtigen Frage beizutragen, ob die Tingierbarkeit des Plasmas mit Uranin Schlüsse über konstitutionelle Eigenschaften des Grundplasmas, vielleicht über den mehr sauren oder neutralen Charakter der Plasmalipoide zuläßt.

2. Die Wirkung des Ammonkarbonat auf die *Allium*-Zellen

In einer methodisch wichtigen Vorarbeit war nun die Wirkung des Ammonkarbonat als solche kennenzulernen. Erstmals verwendete Darwin (1876, S. 38) Ammonkarbonat in seinen Versuchen über die Aggregationsvorgänge in den Epidermiszellen von *Drosera*-Tentakeln, wobei es sich für solche Zwecke als das wirksamste Agens erwies. Auch Scheidl (1954), der die Auslösung von Vakuolenkontraktion mit undissoziierten farbigen und farblosen Basen untersuchte, bediente sich unter anderem derselben Substanz.

Als Versuchsobjekte dienten Schnitte der Oberepidermis der zweiten Schuppe, von außen gezählt, einer anthozyanfreien Zwiebelvarietät. Da die Zellen bei direktem Einlegen zumindest in höherkonzentrierten Lösungen sofort stark geschädigt worden wären, wurde die Präparation so gehandhabt, daß die Schnitte zuerst in einen Tropfen Leitungswasser gebracht und dann nach dem Auflegen eines Deckglases während des Durchsaugens der Lösung mikroskopisch beobachtet wurden. Nur in den relativ unschädlichen Konzentrationsstufen (unter 0,1 Mol) wurden die Schnitte mitunter sofort in

die Lösung eingebracht. Im folgenden seien zuerst die Kern- und hierauf die Plasmaveränderungen geschildert.

a) Kernveränderungen

Die unterste Grenze, bei welcher noch eine Kernveränderung zu beobachten war, lag bei 0,05 Mol, und zwar zeigte sich, daß die wandständigen, laibförmigen Kerne hyalin durchsichtig wurden, wobei die normal runden Kernränder zugleich mit einer Basisverbreiterung und Verminderung der Scheibenhöhe ausgedünnt werden. Es handelt sich offenbar um Solkerne,

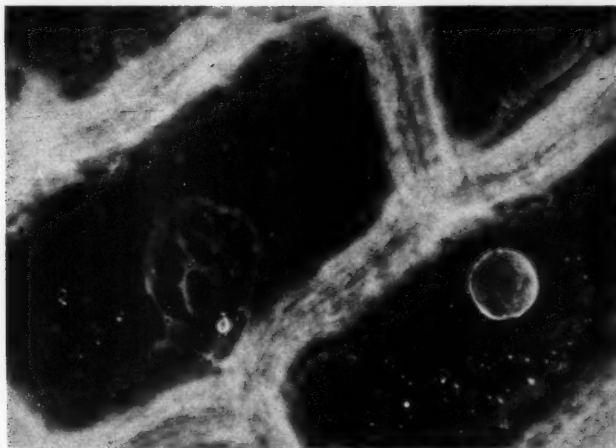


Abb. 1. Kern einer *Allium*-Zelle unter Einwirkung von 0,4 Mol Ammonkarbonatlösung zu einem Wabenartefakt verändert (Anoptalkontrast).

ähnlich wie sie Strugger (1929, 1932) und Bancher (1938) bei K-Salzpasmolyse beobachten konnten.

Über einer Konzentration von 0,1 Mol konnten dann die Kerne, nachdem sie das Hyalinstadium durchlaufen hatten, völlig verschwinden, wie dies auch Schindler (1938) bei Ammoniakwirkung festgestellt hatte. Diese Zellen waren dann unplasmolisierbar.

Verlust der Plasmolisierbarkeit war auch bei allen jenen Zellen zu verzeichnen, in denen die Kerne bei höheren Konzentrationen als 0,1 Mol wie folgt verändert waren. In einem Fall zeigten die kaum verquollenen Kerne keine glatte Kontur mehr, sondern diese war in viele zentrifugale, verzweigte oder unverzweigte Gebilde „ausgefranst“. In meinen Protokollen vermerkte ich diese Erscheinung mit dem Ausdruck „Strahlenartefakt“. In anderen Fällen war diese Veränderung kombiniert mit starker Kernvergrößerung, bei welcher sich in Aufsicht die Kernfläche in ein Netz verschieden stark dimensionierter Spangen aufgegliedert hatte, zwischen die sich dunklere Räume einschoben. Dieses Bild wurde als „Wabenartefakt“ (Abb. 1) vermerkt. Am extremsten war aber jene Veränderung, bei welcher

die wabenbildende Kernsubstanz völlig unzusammenhängend auf einen größeren Zellbereich verteilt lag, so daß der Eindruck entstand, als ob die Kerne „zerspritzt“ wären.

Beim Durchsaugen molarer Ammonkarbonatlösung zeigte sich die Entstehung und zeitliche Reihung einzelner dieser Artefakte. Nach dem Hyalinwerden schwellen die Kerne stark an, wobei die Kernmembran so weit ausgedünnt wird, daß der Kern optisch nicht mehr zu erfassen ist. Hierauf kommt es zum Platzen, an das sich ein Schrumpfungsprozeß anschließt, der in einem Strahlenartefakt endet. Ausgeprägte Wabenartefakte konnten hier nie beobachtet werden.

Über Kernveränderungen finden sich in der Literatur die verschiedensten Hinweise. So berichten Nemec (1910), zit. bei Milovidov und Scarth (1927, S. 196) über Kernschwellung unter Einfluß von Narkotika in bereits schädigender Konzentration, wobei der Inhalt der Kerne verflüssigt worden war, da Scarth beim Durchstoßen der Kernmembran mit der Mikronadel ein abruptes Ausspritzen desselben aus der Verletzungsstelle beobachten konnte. Ebenfalls quellend wirken K-Salze (Küster 1932 b, 1935, Strugger 1929, 1932, Bancher 1938), Ammonnitrat (Milovidov 1949, S. 223), Äther- und Ammoniakdämpfe (Strohmeier 1935). Die Schwellung kann mit dem Platzen enden und zu vorübergehender Unsichtbarkeit der Kerne führen (Scarth 1927, Küster 1932 b).

b) Plasmaveränderungen

Wie Scheidl (1954) dartun konnte, vermögen hypotonische Ammonkarbonatlösungen Vakuolenkontraktion auszulösen, wobei die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Lösung von der Schuppenbasis gegen die Schuppenspitze hin abnimmt. Während bei 0,5 Mol Schnitte der Spitze und Mitte neben Vakuolenkontraktion noch Fälle von Plasmolyse aufwiesen, zeigten Basisschnitte ausschließlich erstere allein. Umgekehrt lag die untere Grenze für die Auslösung einer Vakuolenkontraktion für Basisschnitte bei 0,1 Mol, für Schnitte der Mitte dagegen bei 0,3, für Schnitte der Spitze sogar bei 0,5 Mol.

Da meine Versuchsergebnisse beachtlich von denen Scheidls abweichen, möchte ich meine Beobachtungen etwas ausführlicher referieren.

Vergleicht man eine vakuolenkontrahierte und eine normale Zelle, so fällt sofort ins Auge, daß erstere die so charakteristischen Plasmastränge mit ihrer lebhaften Strömung, kenntlich an den mitbewegten Mikrosomen, nicht mehr aufzuweisen hat. Im Laufe der Plasmaquellung müssen diese also abgebaut worden sein. Dieser Vorgang läßt sich nun beim Durchsaugen von 0,1 Mol Ammonkarbonatlösung prächtig studieren. Der Strangabbau geht dabei so vor sich, daß sich auf Kosten der Strangdicke an verschiedenen Stellen Plasmatröpfchen entwickeln, die zu einem größeren zusammenfließen und schließlich durch Zerreißen und Verkürzung des noch vorhandenen Stranges in das wandständige Plasma eingeholt werden. In den letzten Phasen dieses Vorganges oder auch erst nachher zeigt sich in den Zellecken bereits schwächste Plasmaquellung. Dieser Vorgang ist bei nachfolgender Wässerung reversibel, sofern das Plasma, wie aus den weiteren Ausführungen hervorgehen wird, nicht geschädigt worden

ist. Mit steigender Konzentration der Lösung läßt sich der Abbau weniger schön verfolgen, da die Vakuolenkontraktion oft sehr schnell eintritt und dadurch die Zeit für diesen Vorgang verkürzt wird. Bei rascher Schädigung durch direktes Einlegen der Schnitte in Lösungen höherer Konzentration unterblieb an manchen Zellen der Strangabbau, vielmehr waren die Stränge erhalten geblieben, machten aber einen verfestigten Eindruck. Diese Zellen zeigten sich im nachfolgenden Plasmolyseversuch als tot.

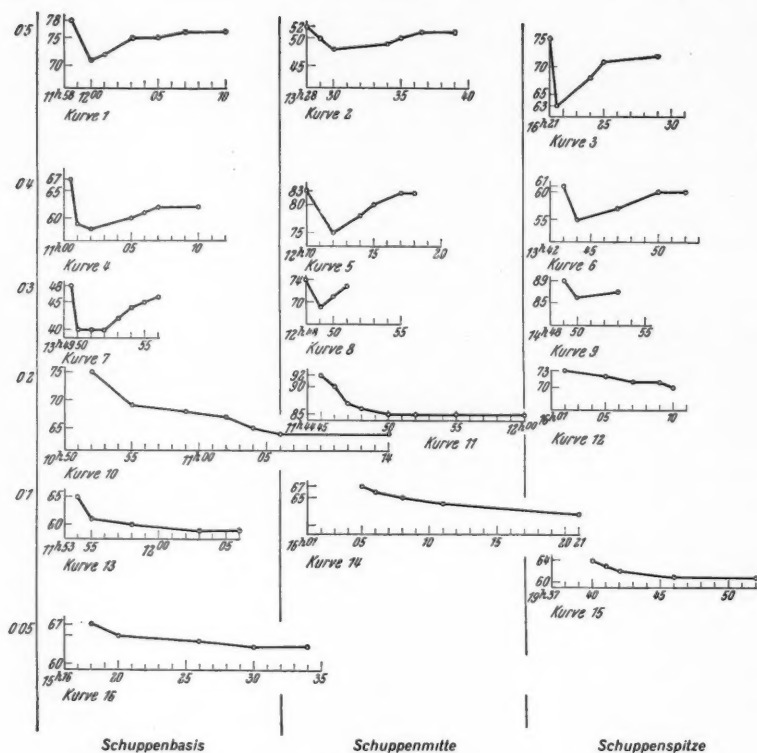
Über Auflösung der Plasmastränge unter den verschiedensten äußeren Einflüssen finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise. Pringsheim (1879) beobachtete an *Spirogyra*-Zellen, die er durch starke Belichtung langsam schädigte, Auflösung eines Teiles der Plasmafäden, die dabei den Kern in das wandständige Plasma einholten, ein anderer Teil blieb zwar wieder erhalten, bildete aber bläschenförmige Gebilde, die als Plasmaknoten bezeichnet wurden. Dieselben Veränderungen beschreibt Lepeschkin (1925) am gleichen Objekt nach schwacher Quetschung der unter dem Deckglas liegenden Fäden und nach Einwirkung von Chloroformwasser, das bei *Primula*-Haarzellen aber manchmal auch zur Strömungssistierung und Strangerstarrung Anlaß geben konnte.

An *Tradescantia*- und *Momordica*-Haaren konnte Klemm (1895) durch extreme Temperaturen, mit verdünnten organischen und anorganischen Säuren und mit einem elektrischen Stromstoß Strangauflösung und Plasmaballung herbeiführen.

Auch Plasmolyse mit K-Nitrat und Ammonkarbonat löst vorübergehend die Plasmastränge auf (Hofmeister 1867, S. 52).

Über die Auslösung der Vakuolenkontraktion unter der Ammonkarbonatwirkung geben die beigefügten Tabellen und Kurven Auskunft, denen hier noch weitere Erläuterungen angeschlossen seien. Beim Durchsaugen der Lösungen ergab sich in den Präparaten eine deutliche Zonierung von außen nach innen, indem die Zellen der randnahen Schnittbezirke rascher und heftiger auf das Agens ansprachen als weiter innen gelegene, bis zu denen sich, durch das Imbibitionswasser der Zellwände bedingt, die Lösung stark verdünnt hatte. Sofort in die Lösung eingebrachte Schnitte zeigten diese Zonierung nicht.

Die Kurven 1—9 beziehen sich alle auf Zellen, die durch die Präparation unverletzt, aber dem der Zusatzstelle der Lösung zugekehrten Schnitttrand nahe gelegen waren. Schon kurze Zeit nach Infiltrationsbeginn setzte eine rasche Kontraktion der Vakuole ein, die in den Kurven als steiler Abfall zum Ausdruck kommt. Das anfangs hyaline, verquollene Plasma mit seiner lebhaften BMB der Mikrosomen beginnt aber dann grobkörnig zu werden und die Wimmelbewegung erlischt. Während dieser Plasmanschädigung dehnt sich trotz ständiger Lösungszufuhr die Vakuole mehr oder weniger rasch wieder aus, erreicht jedoch während der Beobachtungszeit nie ihre ursprüngliche Größe, sondern die äußersten Zellzwickel sind von grobkörnigem Plasma erfüllt, das scheinbar die weitere Diastole hintanhält. Diese Zellen geben mit 0,8 Mol Traubenzucker keine oder bestenfalls noch Tonoplastenplasmolyse. Außerdem sei hier noch vermerkt, daß sich das Ammonkarbonat, auch bei höherer Konzentration der Lösung, als Plasmolytikum völlig ungeeignet erwiesen hatte, da hypertonische Lösungen so schädlich sind, daß Plasmalemma und Binnenplasma sofort absterben und nur der resisten-



Erklärung zu Abb. 2.

Zeichenerklärung: Lz = Zelllänge;

Tstr. = Teilstriche des Okularmikrometers;

Vk = Vakuolenkontraktion.

Kurve 1: 5. unverletzte Zelle vom Schnitttrand Lz = 78 Tstr.: fünf Minuten nach Durchsaugbeginn ist das Plasma grobkörnig, der Kern zeigt Strahlenartefakt, nach weiteren 7 Minuten ist die Zelle unplasmolysierbar.

Kurve 2: 4. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, Lz = 52 Tstr.: 2 Minuten nach Durchsaugbeginn ist der Kern zerspritzt, nach insgesamt 11 Minuten die Vakuole fast völlig ausgedehnt, die Zelle aber unplasmolysierbar.

Kurve 3: 3. unverletzte vom Schnitttrand Lz = 75 Tstr.: 3 Minuten nach Infiltrationsbeginn ist das Plasma grobkörnig, die Zelle nach weiteren 5 Minuten unplasmolysierbar.

Kurve 4: 3. unverletzte Zelle vom Schnitttrand Lz = 67 Tstr.: 5 Minuten nach Infiltrationsbeginn ist das Plasma grobkörnig, nach weiteren 5 Minuten keine Plasmolyse möglich.

Kurve 5: 2. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, Lz = 83 Tstr.: 5 Minuten nach Durchsaugbeginn ist der Kern zerspritzt, das Plasma destruiert und nach weiteren 3 Minuten die Zelle unplasmolysierbar.

tere Tonoplast überdauert, der auf die osmotischen Verhältnisse mit einer Kontraktion antwortet. Mitunter plasmolysierten wohl einige Zellen, doch starben sie unter Plasmaquellung schon nach wenigen Minuten ab. Deshalb wurde auch die oben erwähnte Präparation gewählt.

Die Kurven 9—12 zeigen bereits einen langsameren Kontraktionsverlauf, die Zellen sterben jedoch auch hier bei nachfolgender Plasmolyse noch ab. Es liegt hiermit ein Übergang vor, denn in der nächst niedrigeren Konzentration verläuft die Vakuolenkontraktion noch langsamer (flacher Kurvenverlauf in den Kurven 13—16) und die Zellen gehen ihrer Plasmolysierbarkeit nicht mehr verlustig.

Mit fallender Konzentration der Lösungen verschmälert sich das Areal mit absterbenden Zellen, bis es schließlich bei 0,1 Mol mit dem Schnitttrand zusammenfällt.

Kurve 6: 4. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 61$ Tstr.: 5 Minuten nach Infiltrationsbeginn zeigt der Kern Wabenartefakte, die Mikrosomen keine BMB und nach weiteren 5 Minuten ist die Zelle unplasmolysierbar.

Kurve 7: 3. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 48$ Tstr.: 4 Minuten nach Durchsaugbeginn zeigt der Kern Strahlenartefakt, das Plasma ist grobkörnig und nach weiteren 3 Minuten die Zelle nicht mehr plasmolysierbar.

Kurve 8: 2. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 74$ Tstr.: 3 Minuten nach Infiltrationsbeginn ist das Plasma grobkörnig, die Zelle spricht auf Plasmolyse nicht mehr an.

Kurve 9: 4. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 89$ Tstr.: 2 Minuten nach Durchsaugbeginn ist der Kern hyalin, nach weiteren 3 Minuten das Plasma grobkörnig, und bei Plasmolyse kontrahiert sich nur mehr der Tonoplast.

Kurve 10: 5. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 75$ Tstr.: 5 Minuten nach Infiltrationsbeginn zeigt die Zelle nur an einem Pol Vk , im völligen hyalinen Plasma sind die Mikrosomen in lebhafter BMB. Nach weiteren 7 Minuten ist auch am anderen Zellpol die Vakuole kontrahiert. 24 Minuten nach dem Durchsaugbeginn ist die Zelle nur mehr zu Tonoplastenplasmolyse fähig.

Kurve 11: 3. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 92$ Tstr.: 1 Minute nach Infiltrationsbeginn setzt die Vk ein, nach weiteren 3 Minuten ist der Kern hyalin und 12 Minuten später die Zelle trotz hyalinem Plasma, das lebhaft Mikrosomenbewegung aufweist, nur mehr zu Tonoplastenplasmolyse fähig.

Kurve 12: 5. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 75$ Tstr.: 11 Minuten nach Infiltrationsbeginn zeigt der Kern Strahlenartefakte, die Zelle nur zu Tonoplastenplasmolyse fähig.

Kurve 13: 5. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 65$ Tstr.: 10 Minuten nach Infiltrationsbeginn ist der Kern hyalin, die Vk zum Stillstand gekommen, und nach weiteren 3 Minuten läßt sich die Zelle normal plasmolysieren.

Kurve 14: 5. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 67$ Tstr.: Erst 4 Minuten nach Infiltrationsbeginn setzt die langsam verlaufende Vk ein, nach weiteren 16 Minuten ergibt sich bei Plasmolyse konkave Abhebung des Protoplasten von der Membran.

Kurve 15: 4. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 64$ Tstr.: 3 Minuten nach Durchsaugbeginn setzt die Vk ein, die Zelle ist nach weiteren 12 Minuten plasmolysierbar.

Kurve 16: 3. unverletzte Zelle vom Schnitttrand, $Lz = 67$ Tstr.: 18 Minuten nach Infiltrationsbeginn ist der Kern hyalin, die Zelle normal plasmolysierbar.

Gegen das Schnittzentrum zu tritt die Vakuolenkontraktion später ein, verläuft weniger überstürzt und die Zentrumzellen zeigen nach Wässern bis zu einer halben Stunde wieder normale Plasmakonfiguration, d. h. Plasmastränge mit Strömung, und sind überdies noch plasmolysierbar. Zu lange Einwirkungsdauer ist jedoch auch hier in Abhängigkeit von der Konzentration sehr schädigend und die Zellen sterben ab. Auch der mittlere Kontraktionsgrad, das Verhältnis von Vakuolenlänge zu Zelllänge, wurde bestimmt und in Tab. 1 zusammengefaßt. An deren unterem Ende kommt das verschiedene Verhalten der Schnitte aus der Schuppenbasis, -mitte und -spitze den Lösungen gegenüber deutlicher zum Ausdruck: Während die

Tab. 1. Stärke der Vakuolenkontraktion im Schnittzentrum.

Konz. (NH ₄) ₂ CO ₃	Vakuolenlänge : Zelllänge		
	Schuppenbasis	Schuppenmitte	Schuppen spitze
0,6	0,95 (12)	0,94 (9)	0,94 (12)
0,5	0,95 (6)	0,96 (9)	0,94 (7)
0,4	0,92 (9)	0,94 (8)	0,94 (11)
0,3	0,95 (7)	0,94 (11)	0,95 (7)
0,2	0,93 (29)	0,96 (16)	0,95 (10)
0,1	0,94 (25)	0,95 (5)	0,95 (15)
0,05	0,93 (5) E	0,98 (6) E	0,98 (7) E
	0,95 (15)	0,98 (20) E	0,98 (4) E
0,01	0,98 (5) E	1,00	1,00

Die in Klammern stehenden Zahlen bedeuten die Einwirkungsdauer der Lösung angegeben in Minuten. In den mit E gekennzeichneten Fällen wurden die Schnitte direkt in die Lösung eingelegt, während im übrigen durchsaugend infiltriert wurde. Die unterhalb des Trennungsstriches liegenden Angaben beziehen sich auf Präparate, in denen nur mehr vereinzelt Vakuolenkontraktion auftrat, während in allen übrigen Fällen Allgemeinkontraktion zu verzeichnen war.

Basisschnitte noch bei 0,05 Mol Allgemeinkontraktion zeigen, weisen Schnitte der Spitze und Mitte bei dieser Konzentration nur mehr einzelne Zellen mit Vakuolenkontraktion auf, deren Grad auch noch schwächer ist. Die nächst niedrigere Konzentration löst in den Basiszellen nur mehr vereinzelte, in den übrigen Schuppenabschnitten aber keine Kontraktion der Vakuolen mehr aus.

Es ergibt sich noch die Frage nach der Konzentrationsstufe, bei der auch bei direktem Einbringen der Schnitte in die Lösung die Zellen nicht mehr absterben. Nach meinen Versuchen dürfte die äußerste Grenze der Unschädlichkeit bei 0,1 Mol liegen, wo die empfindlicheren Basisschnitte nach elf Minuten noch allgemein, nach zwanzig Minuten aber nur mehr vereinzelt plasmolysierbare Zellen besaßen.

Zusammenfassend ergibt sich also ein von Scheidls Ergebnissen abweichendes Bild: Auf Grund der Schädlichkeit des Ammonkarbonats kommt es in hypertonischen Lösungen nie zu Plasmolyse, sondern es kontrahieren nur mehr die resistenteren Tonoplasten, Binnenplasma und Plas-

malemma sterben ab. Mit fallender Konzentration kommt es dann zur Auslösung von Vakuolenkontraktion, wobei im Durchsaugungsverfahren die schnitt-randnahen Zellen rascher und heftiger reagieren und deshalb in Übereinstimmung mit den Ergebnissen Hennes (1934) in ihrer Vitalität stärker beeinträchtigt werden und früher absterben als die Zellen des Schnittzentrums, die, sofern die Einwirkungsdauer nicht zu stark ausgedehnt wird, plasmolysierbar bleiben. Erst ab 0,1 Mol werden die Schnitte auch bei direktem Einlegen in die Lösung nicht mehr geschädigt und die Zellen zur Vakuolenkontraktion veranlaßt, wobei sich wie in den Versuchen von Houska (1939, 1941) und Scheidl (1954) die einzelnen Schuppenabschnitte verschieden verhalten hatten. So verläuft die Vakuolenkontraktion in den Zellen von der Basis gegen die Spitze hin langsamer und nimmt in gleicher Richtung an Stärke ab. Während die empfindlicheren Basisschnitte noch bei 0,05 Mol allgemeine, bei 0,01 Mol noch vereinzelte Vakuolenkontraktion erkennen lassen, zeigen die Schnitte der Schuppenmitte und -spitze dagegen bei 0,05 Mol nur mehr vereinzelte Zellen mit gequollenem Plasma und kontrahierter Vakuole.

3. Verminderung der Tingierbarkeit durch Vorbehandlung der Schnitte mit Ammonkarbonat

a) Durchsaugerversuche

In den oben geschilderten Versuchen trat bei durchsaugender Infiltration der Schnitte mit höherkonzentrierten Ammonkarbonatlösungen eine Zonierung der Art auf, daß die Zellen mit der Entfernung vom Schnitttrand gegen das Zentrum zu immer weniger geschädigt wurden und demnach außen keine, weiter innen Tonoplasten- und schließlich normale Plasmolyse zeigten. Da die Uraninfluorochromierung des Plasmas nach Höfler, Ziegler und Lühn (1956) als Lebensreagens anzusehen ist, so war zu erwarten, daß die verschieden starke oder nicht erfolgte Schädigung auch in der Tingierbarkeit zum Ausdruck kommen müßte.

Die Präparation wurde wie folgt gehandhabt: Nach kurzem Entlüften der Schuppe wurde je ein Schnitt aus jeder Schuppenregion in einen Wassertropfen auf den Objektträger gebracht, worauf nach Auflegen eines Deckglases bei allen Präparaten mit dem Durchsaugen der jeweiligen Lösung begonnen wurde. Um die Ergebnisse möglichst vergleichbar zu bekommen, wurde darauf geachtet, daß während der folgenden vier Minuten ungefähr dieselbe Menge der Lösung jedes Präparat durchströmte. Um durch anhaftende Lösung das cH und damit die Konzentration der permeierfähigen Moleküle der Farblösung nicht zu verschieben, wurden die Schnitte kurz mit Leitungswasser abgespült. Fünf Minuten in Uranin 1 : 10.000 pH 4,8 gefärbt, wurde nach gehörigem Auswaschen mit gleichnamigem verdünntem Puffer, in 0,8 Mol gepufferter Traubenzuckerlösung plasmolysiert.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzstärke wurden zum Vergleich jeweils ein normal tingierter und ein unbehandelter Schnitt, die ebenfalls plasmolysiert waren, herangezogen. Zu diesen eindeutig definierten Marken konnten die jeweiligen Zwischenstufen geschätzt werden. Abweichend von den

Angaben Drawerts (1952 a), wonach das Plasma der *Allium*-Zellen schwach gelbe Eigenfluoreszenz haben soll, lag diese stets hellblau vor, was auf die Verwendung verschiedener Lichtquellen zurückzuführen sein dürfte. Bei kurzer UV-Bestrahlung schlug sie jedoch nach Gelb um.

Erwartungsgemäß zeigte sich in den Präparaten auch bezüglich der Fluoreszenzwerte eine Zonierung. So fand sich außen ein Gürtel toter, fluoreszenzfreier Zellen, zwischen denen sich noch vereinzelt Zellen mit Tonoplastenplasmolyse zeigten, deren Plasma aber keine, oder kaum wahr-

Tab. 2. Tingierbarkeitsverminderung durch Ammonkarbonatvorbehandlung von vier Minuten langer Dauer.

Konz. in Mol	Schuppenbasis			Schuppenmitte			Schuppenspitze		
	Toter Rand	Über- gangs- zone	Zentrum	Tote Zell- reihen	Über- gangs- zone	Zentrum	Tote Zell- reihen	Über- gangs- zone	Zentrum
0,6	80%	+-		10-12	+-		10-12	+-	+-, E
0,5	80%	+-		10-12	+-		8-10	+-	+-, E
0,4	90%	++		8-10	+-	+-, E	8-10	+-	+-, E
0,3	70%	E		6-10	+-	+-, E	6-8	+-	+-, E
		+-							
0,2	50%	+-		3-5	+-	+-, +	1-2	+-	+-, E
0,1	5%	++	+-	+	+		+	+-	+-, +
0,05	+++	+		++	+		+	+	
0,01	+++	+		++	+		++	+	

Zeichenerklärung:

- | | | |
|------|---|-----------------|
| +++ | Fluoreszenzstärke der Zellen mit Vakuolenkontraktion | } der Kontrolle |
| ++ | Fluoreszenzstärke normaler Zellen | |
| + | Fluoreszenzstärke etwas schwächer als normale Zellen | |
| +- | Fluoreszenzstärke deutlich schwächer als normale Zellen | |
| +- | Fluoreszenz sehr schwach, aber deutlich | |
| +--- | Fluoreszenz kaum von Eigenfluoreszenz zu unterscheiden | |
| E | Eigenfluoreszenz des Plasmas. | |

nehmbare Fluoreszenz aufzuweisen hatte. Je nach Konzentration der durchgesaugten Lösung war jener Bereich größer oder kleiner und zeigte nach innen zu einen Übergang, der im Idealfall einen geschlossenen Kreis von Zellen darstellte, die sich durch stärkere Fluoreszenz als alle übrigen Zellen auszeichneten. In vielen Fällen war jene Übergangszone nicht annähernd geschlossen, sondern nur auf die eine oder andere Stelle beschränkt und konnte schließlich auch völlig fehlen. Mit fallender Konzentration rückte sie immer näher an den Schnitttrand heran, bis sie endlich mit diesem zusammenfiel.

Diese Zonierung oder deren Andeutung fand sich in allen Spitzenpräparaten, während sie in den Schnitten der Mitte von 0,5, in denen der Basis von 0,2 Mol abwärts in Erscheinung trat (vgl. Tab. 2). In diesem

Bereich gilt auch allgemein, daß die Tingierbarkeit der Zellen mit fallender Konzentration der Ammonkarbonatlösung und unter gleichen Verhältnissen von der Spitze gegen die Basis hin zunimmt.

Oberhalb jener angegebenen Konzentrationsgrenzen zeigten die Präparate keine Zonierung. Hier war ein Großteil der Zellen abgestorben, der noch überlebende Teil hatte aber stärkere Fluoreszenz als nach der Ammonkarbonatkonzentration zu erwarten gewesen wäre. Instrukтив war diesbezüglich das Verhalten der Basisschnitte und hier insbesondere bei 0,4 Mol: Während in einem Schnitt alle Zellen abgestorben waren, lebten in einem anderen nur mehr 10%, die zu einer Insel zusammengeschlossen waren, aber ihre Fluoreszenz stand der des uraningeprägten Kontrollschnittes in keiner Weise nach. Ähnlich war es auch bei 0,2 Mol, wo wohl noch 50% Zellen lebten, die aber auf drei Zellbänder verteilt waren, zwischen welche sich die Areale mit den toten, nicht fluoreszierenden Zellen einschoben.

Für dieses Verhalten können nun folgende Ursachen maßgebend sein. Wie wir unter anderem aus den Vitalfärbeversuchen Struggers (1936) mit Neutralrot wissen, ist der Zellsaft der Zwiebelepidermiszellen schwach sauer. Sobald nun beim Absterben der Zellen die Permeationsschranken für diesen Zellsaft zusammenbrechen, tritt er nach außen und könnte nun die Wirkung der basischen Ammonkarbonatlösung dahingehend abschwächen, daß die überlebenden Zellen in ihrer Speicherfähigkeit kaum eine Veränderung erfahren würden. Die überaus starke Diffusionsfähigkeit des aus der Ammonkarbonatlösung stammenden Ammoniak, um das es sich hier hauptsächlich handeln wird, und das ständig kräftige Durchsaugen, durch welches der austretende Zellsaft sicher hinweggeführt wurde, lassen indes diese Annahme gegenüber einer anderen unwahrscheinlich erscheinen. Wenn nämlich das Gros der Zellen in den in Frage stehenden Fällen abgestorben war, so läßt sich wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die restlichen Zellen, obwohl noch zu normaler Plasmolyse fähig, auch in Mitleidenschaft gezogen worden waren und vielleicht auf Grund dieser schwachen Insultierung zu gesteigerter Tingierbarkeit angeregt werden. Für diese Annahme spricht auch das Verhalten der Zellen am Präparatrand, die durch den Schnitt bedingte Vakuolenkontraktion aufweisen und deren Plasma stärker Uranin zu speichern vermag. Daß dieses Verhalten besonders in den Basispräparaten so deutlich zu Tage tritt, ist nicht zu verwundern, da, wie wir schon aus den Versuchen über die Auslösung der Vakuolenkontraktion sahen, die Basis viel empfindlicher auf die Ammonkarbonatlösung anspricht als die Mitte oder Spitze. In diese Erklärung würden sich dann auch die Zellen der Übergangszone einfügen, die von der Lösung stärker beeinflusst werden als weiter innen gelegene und deshalb auch zu stärkerer Speicherung angeregt werden.

Wieder übereinstimmend mit der größeren Unempfindlichkeit gegen die Lösungen, zeigen dagegen die Spitzenschnitte außen eine mehr oder weniger schöne Zonierung. Die Übergangszellen mit stärkerer Fluoreszenz sind mit den oben beschriebenen Basiszellen zu vergleichen. Weiter innen zeigen die Zellen minimale oder gar keine Fluoreszenz, woraus geschlossen werden könnte, daß diese abgestorben waren. Daß dem aber nicht so ist, geht aus der konvexen und konkaven Plasmolyseform hervor, wobei letztere auch mit Plasmasystrophe verbunden sein kann. In diesem Falle liegt der Kern meist wandständig an der Vakuolenlängsseite und die Plasmaballung um ihn kann so stark sein, daß die Vakuole tief eingesattelt wird. Es handelt sich nach Germ (1932) demnach um eine „perfekte Systrophe“. Die Plas-

molysierbarkeit und Systrophe garantieren die Vitalität der Zellen. Hier liegt also der extreme Fall vor, daß die normalerweise lebhaft speichernden Zellen unter der Wirkung des Ammoniaks ohne Verlust ihrer Vitalität keinerlei Farbstoff in das Plasma aufnehmen können.

Sobald die Schnitte bei den niedrigen Konzentrationen auch am Präparatrand keine toten Zellen mehr erkennen lassen, erweisen sich die Zellen des Schnitttrandes, die Vakuolenkontraktion haben, dem Ammoniak gegenüber als unempfindlicher als nicht vakuolenkontrahierte Zentrumszellen, indem sie stärkere Fluoreszenz zeigen. Da die Plasmaquellung in diesen Zellen traumatisch bedingt ist, ist dieser Fall besonders interessant, da er zeigt, daß dieses Plasma in seiner erhöhten Speicherkapazität für das Uranin auch durch vorausgehende Ammonkarbonatbehandlung nur wenig beeinflussbar ist.

Zusammenfassend steht also fest, daß durch Ammonkarbonatvorbehandlung die Tingierbarkeit der Zellen völlig oder teilweise verlorengehen kann. Für noch plasmolysierbare, überlebende Zellen solcher Präparate, in denen das Gros abgestorben war, wird eine leichte Schädigung angenommen, die sich durch bessere Uraninspeicherung kundtut. Gleiches Verhalten wird den Zellen der Übergangszone zugeschrieben. Zellen mit traumatisch bedingter Vakuolenkontraktion, meist am Schnitttrand gelegen, werden in ihrer Tingierbarkeit durch das Ammoniak weniger beeinflusst als die intakten Zellen des Schnittzentrums.

b) Kurzversuche

Bei dieser Versuchsanstellung kam es hauptsächlich darauf an, das Verhältnis zwischen Ammonkarbonatkonzentration und Tinktionsfähigkeit der Zellen zu ermitteln. Je drei Schnitte wurden direkt in die jeweilige Lösung eingetaucht. Die Einwirkungszeit wurde mit einer, zwei, fünf und zehn Sekunden festgesetzt. Hierauf wurde die oben geschilderte Weiterbehandlung durchgeführt. Auch hier untersuchte ich alle drei Schuppenregionen nacheinander unter denselben Bedingungen und zog zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität entsprechende, normal tingierte und ungefärbte Schwesterschnitte heran.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tab. 3 zusammengefaßt, die aber nur jene Fluoreszenzwerte wiedergibt, die dem Gros der Zellen entsprachen. Die unmittelbaren Randzellen, sofern sie nicht abgestorben waren, zeigten diesen gegenüber stets stärkere Fluoreszenz und meist auch gequollenes Plasma.

Wie man der Tabelle unschwer entnehmen kann, nimmt auch hier mit Verlängerung der Einwirkungszeit und mit steigender Konzentration der Ammonkarbonatlösung die Tingierbarkeit des Plasmas ab, wobei sich auch die Schnitte der einzelnen Schuppenregionen verschieden verhalten. Wieder zeigt sich, daß die Basis auf die speicherungshemmende Wirkung des Ammonkarbonats am schwächsten anspricht. Dies geht besonders bei den obersten und untersten Konzentrationsstufen hervor. Während die Eigenfluoreszenz bei den Basisschnitten nur auf 0,6 Mol beschränkt ist, tritt sie bei 0,4 Mol noch in der Mitte, bei 0,3 Mol noch in der Spitze auf, reicht also hier noch viel tiefer herab. Weiters zeigte sich in den Basisschnitten bei einer Sekunde langer Einwirkung eine nie so starke Fluoreszenzverminderung gegenüber dem Kontrollschnitt als bei der Mitte oder Spitze. Auch

Tab. 5. Fluoreszenzverminderung durch Ammonkarbonatbehandlung.

Konz. in Mol	Schuppenbasis				Schuppenmitte				Schuppenapitze			
	Einwirkungs- dauer in Sek.				Einwirkungs- dauer in Sek.				Einwirkungs- dauer in Sek.			
	1	2	5	10	1	2	5	10	1	2	5	10
0,6	+	+	+	+	E	E	+	+	E	E	E	— (100)
0,5	+	+	+	+	E	E	+	+	E	E	+	— (90)
0,4	+	+	+	+	+	+	+	+	E	E	E	E
0,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Protoplasma, Bd. LII/3

die Fluoreszenzgleichheit mit dem Kontrollschnitt war für die Basis bei zehn Sekunden langer Einwirkung bei 0,01 Mol erreicht, während die Schnitte der Mitte oder Spitze bei denselben Verhältnissen noch eine Nuance schwächer leuchteten.

In den mittleren Konzentrationsbereichen kommt der schwächere Unterschied zwischen Mitte und Spitze zum Ausdruck.

Daß die Zellen mit schwacher oder Eigenfluoreszenz auch hier nicht geschädigt oder abgestorben sind, kann aus der konvexen oder konkaven Plasmolyseform erschlossen werden. Außerdem wurde nicht selten auch mehr oder weniger starke Strömung in den entweder nicht abgebauten oder während der Färbung restituierten Plasmasträngen beobachtet.

Der allgemeinen Feststellung, daß die Tingierbarkeit mit steigender Einwirkungszeit und Konzentration der Lösung abnimmt, widersprechen jene Fälle, die in der Tabelle durch in Klammer stehende Angabe des Prozentsatzes an toten Zellen des gesamten Schnittes hervorgehoben sind. Es waren dies durchwegs Präparate, in denen die Hälfte aller Zellen abgestorben war und die überlebenden, entweder einzeln liegenden oder zu Gruppen von zehn bis dreißig zusammengeschlossenen Zellen inselartig über die Areale mit den toten Zellen verstreut waren. Diese Zellen zeigten stärkere Fluoreszenz des Plasmas als man nach der Konzentration der Ammonkarbonatlösung erwarten durfte. Im folgenden seien diese Fälle im einzelnen etwas genauer referiert.

Basis: Hier waren nach zehn Sekunden langer Einwirkung 0,6 Mol Lösung und nach der Uraninfärbung nur mehr zehn Prozent aller Zellen zur Plasmolyse befähigt, die aber einen sehr krampfartigen Eindruck machte. Die Fluoreszenz war nur

etwas schwächer als die des Kontrollschnittes. Außerdem fanden sich noch einige Zellen im Tonoplastenstadium, die aber keine oder äußerst schwache Fluoreszenz hatten. Ähnliches Verhalten zeigte sich bei 0,2 Mol und fünf Sekunden und in der nächst niedrigeren Konzentrationsstufe.

Mitte: Hier zeigte sich der Zusammenhang zwischen Schädigung und Fluoreszenzstärke besonders deutlich. So waren nach zehn Sekunden langer Einwirkung von 0,6 Mol bzw. 0,5 Mol neunundneunzig Prozent aller Zellen tot und es lebten im einen Falle nur noch fünf, im anderen nur mehr vier Zellen, die aber noch relativ starke Fluoreszenz hatten und plasmolysiert waren, während die Schwesterschnitte bei gleicher Konzentration, aber kürzerer Expositionszeit nur Eigenfluoreszenz zeigten. In den übrigen Fällen dieser Region lagen die Verhältnisse ähnlich, nur war der Prozentsatz der abgestorbenen Zellen geringer und die überlebenden Zellen in mehreren Inseln vereinigt.

Spitze: Hier konnte dieses Verhalten nur bei 0,5 Mol und fünf bzw. zehn Sekunden beobachtet werden.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Tingierbarkeit auch hier mit Steigerung der Konzentration und Expositionszeit abnimmt und bis zur völligen Speicherunfähigkeit herabgedrückt werden kann. Abseits dieser Regel stehen jene Zellen, die am Schnitttrand liegen, und jene, die noch überdauerten, wenn ein Großteil aller Zellen eines Präparates abgestorben war. Von diesen wird auch hier angenommen, daß sie durch die Insultierung durch die Lösung in einem prämortalen Reizzustand zu besserer Speicherung des Farbstoffes befähigt sind.

c) Weitere Beobachtungen an fluorochromierten nekrotischen und toten Zellen

Im Verlauf der vorangegangenen Fluoreszenzversuche wurden auch mitunter Beobachtungen festgehalten, die aber nicht näher analysiert worden waren.

In den Durchsaugversuchen, bei denen die Schnitte nach der Färbung aber nicht sofort plasmolysiert, sondern nach dem Auswachsen in verdünnter Pufferlösung gleich fluoreszenzoptisch untersucht wurden, zeigten sich in der Übergangszone mitunter Zellen, die nur mehr zur Hälfte fluoreszierten. Der dem Schnittzentrum zugekehrte Zellpol wies noch schwache Vakuolenkontraktion auf, das verquollene Plasma, mit im Hellfeld deutlich sichtbarer Wimmelbewegung der Mikrosomen, stand in seiner Leuchtkraft den normal tingierten Zellen des Kontrollschnittes nur wenig nach. Auch das übrige Plasma dieser Zellhälfte, meist zu mehreren wandständigen Tröpfchen geballt, zeigte noch Fluoreszenz. Die dem Schnitttrand zugekehrte Zellhälfte war dagegen fluoreszenzfrei und das Plasma erschien bei Hellfeldbetrachtung destruiert. Sofern auch der Kern in dieser Hälfte lag, war er stets fluoreszenzfrei und zu einem Artefakt verändert. Es handelt sich im Sinne Küsters (1924) hier also um eine „lokale Tötung“. Wurden solche Zellen einer hypertonen Traubenzuckerlösung ausgesetzt, so ergab sich bestenfalls noch Tonoplastenplasmolyse, wobei die Fluoreszenz verschwand.

Dieser Fall ist insofern von Interesse, da er zeigt, daß Plasmabezirke ein und derselben Zelle abgestorben sein können, während sich andere mit

Uranin noch stark zu beladen vermögen. Überdies wird auch hier wieder evident, daß prämortale Zellen stärker speichern und die Schädigung von der Ammonkarbonatlösung herrühren muß, wofür in diesem Falle ganz klar die Polarität der Erscheinung spricht.

Eine andere oft beobachtete Erscheinung war besonders auf die Randgebiete der Schnitte beschränkt. Einzelne Zellen hatten entweder von vornherein sehr starke Vakuolenkontraktion oder sie zeigten bei Plasmolyse nur mehr Tonoplastenverkleinerung. Ihre Fluoreszenz war meist sehr schwach, doch fanden sich auf diesem matten Hintergrund stärker leuchtende Pünktchen, die sich manchmal noch in deutlicher Wimmelbewegung

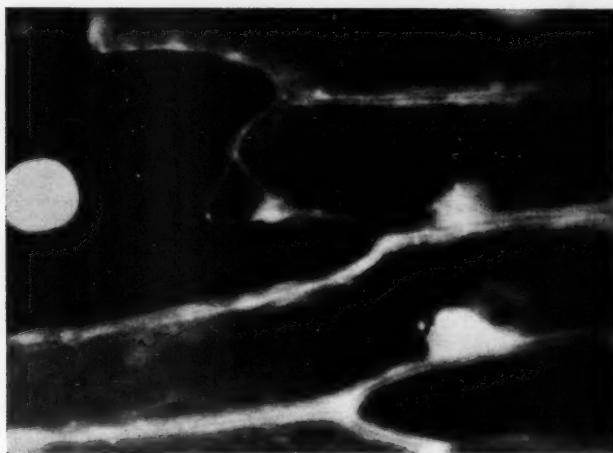


Abb. 3. Eine durch den Schnitt verletzte Randzelle zeigt einen lebhaft fluoreszierenden Teiltonoplasten.

befanden, sofern das Plasma noch hyalin und nicht grobkörnig verändert war. Bei vergleichender Untersuchung im Hellfeld konnte ein Teil dieser Pünktchen sicher als Sphärosomen erkannt werden, doch ließ sich nicht mit Sicherheit feststellen, ob es ausschließlich solche waren oder ob sich nicht auch degenerierte Chondriosomen darunter befanden. Es war nun zu klären, ob diese „Mikrosomen“ im Sinne Hansteins (1880) und Höflers (1957) nur in stark nekrotischen Zellen fluoreszieren oder ob dies auch in völlig vitalem Plasma der Fall wäre. An plasmolysierten Zellen, die Teilprotoplasten gebildet hatten, konnte nun auch an Mikrosomen in den Plasmasträngen zwischen den Teilprotoplasten das Leuchten beobachtet werden, wenn dies auch wegen der stärkeren Fluoreszenz des Grundplasmas hier weniger auffällig war. Es ist bekannt, daß die Sphärosomen unter gewissen Bedingungen saure und basische Stoffe zu speichern vermögen (Drawert 1952 b, 1953, 1955, Perner 1952, 1953, Strugger 1959, Mix 1958).

Eine andere Erscheinung war nur auf die vom Schnitt getroffenen Randzellen beschränkt. In diesen Zellen fanden sich im grobkörnigen Plasma-koagulum deutlich umhätete Bläschen verschiedener Größe und Zahl, von denen einige noch sehr grell fluoreszierten, andere aber wieder völlig dunkel blieben. In einem Fall erreichte die Uraninspeicherung in einer großen Blase solche Intensität, daß bereits im Hellfeld eine deutliche Gelbfärbung zu bemerken war (vgl. Abb. 3¹). Es könnte sich hier um Teiltonoplasten handeln, die durch Einschnürungsvorgänge, wie dies Küster (1929) an schnittverletzten Zwiebelzellen beobachten konnte, aus dem ungeteilte Tonoplasten hervorgegangen sind.

4. Zum Phänomen der Umlagerung

Da der Färbung vorausgehende Behandlung mit Ammonkarbonat die Tingierbarkeit der Zwiebelzellen verminderte oder unterband, war zu erwarten, daß auch der umgekehrte Vorgang, Einwirkung von Ammonkarbonat auf normal tingierte Schnitte, eine Änderung des Fluoreszenzbildes mit sich bringen würde. Dies war tatsächlich der Fall, und zwar kam es zu einer Umlagerung, d. h. zu einer Farbstoffverschiebung vom Plasma nach der Vakuole, die aber bei Plasmaquellung unterblieb.

Döring (1935) machte die Beobachtung, daß nach zwölf- bis achtzehnstündigem Aufenthalt in der Farblösung oder in Leitungswasser *Allium*-Schnitte ihre grelle Kern- und Plasmafluoreszenz unter gleichzeitiger Vakuolenfärbung verlieren. „Das Fluorescein wird also anfangs vom Plasma gespeichert, allmählich erfolgt eine ‚Umstimmung‘; das Plasma speichert dann den Farbstoff nicht mehr, läßt ihn aber zur Vakuole hindurch, wo er angereichert wird.“ Eine Ausnahme machten nur jene Zellen, deren Plasma verquollen war und den Farbstoff stärker festhielt, so daß die Vakuolen nur schwach angefärbt wurden. Höfler, Ziegler und Luhan bestätigen dies, bezeichneten aber den Vorgang mit dem besseren Ausdruck „Umlagerung“.

Einen anderen von Döring an Stengelschnitten von *Pelargonium* beschriebenen Effekt, wonach Vorwässern der Schnitte eine Plasmafärbung unterband und der Farbstoff sofort zur Vakuole hindurchgelassen wurde, konnten Höfler, Ziegler und Luhan dagegen am gleichen Objekt nicht feststellen. Bei der daraufhin angestellten Untersuchung eines größeren Pflanzenmaterials fand sich dieses Verhalten dann bei den Epidermiszellen von *Listera ovata*, wo sich nach Vorbehandlung mit Leitungswasser und alkalischen Phosphatpuffern sofort die Vakuolen anfärbten. Gleiches Ergebnis erbrachten die Versuche an Markzellen von *Impatiens nolitangere*, Corollzellen von *Lilium regale* und den Idioblasten von *Scrophularia*.

Noch einen anderen Faktor untersuchten die oben genannten Autoren. Ließen sie Schnitte unter Deckglasabschluß und bei Zusatz von unschädlichen Mengen von H_2O_2 umlagern, so war der Prozeß im ersten Fall verzögert, im zweiten dagegen beschleunigt, woraus auf maßgebliche Beteiligung der Atmungsvorgänge geschlossen wurde (S. 346). Die Verhinderung der Umlagerung durch Zusatz des Atmungsgiftes Dinitrophenol schlug da-

¹ Die Abbildungen 3–9 sind im Original Farbaufnahmen auf Super Anscochrome (21/10 DIN).

gegen fehl, vielmehr wurde die Farbstoffverschiebung bei geringer Dosis sogar beschleunigt, was auf Atmungsstimulierung zurückgehen könnte (vgl. Allen und Price 1950, S. 399). Atmungsgebundene Farbstoffaufnahme und -speicherung ist bereits aus vielen Arbeiten bekannt.

Nachdem seit den ersten positiven Befunden Pfeffers (1886, S. 266) und Overtons (1900, S. 671) über die Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Farbstoffe die widersprechendsten Ergebnisse berichtet worden waren (Ruhland 1909, S. 31, 1912, 1913, S. 308, Küster 1912, Rhode 1917), stellte Collander (1921) fest, daß Cyanol, Orange G, Methylorange, Ponceau R und Wollviolett S in gewisse pflanzliche Zellen gar nicht oder nur sehr langsam und spärlich aufgenommen werden, wobei auch nach tagelangem Aufenthalt in der Farblösung die Vakuolen geringere Farbstoffkonzentrationen aufweisen als das Farbbad. Eine Sonderstellung nahmen nur Blumenblatt-, Meristem- und Leitbündelparenchymzellen ein, welche die untersuchten sauren Farbstoffe über den Konzentrationsausgleich hinaus in der Vakuole zu speichern vermochten. Diese Aufnahme zeigte sich aber von Außenfaktoren abhängig, indem sie durch niedrige Temperatur und Narkotika gehemmt, durch hohes cH begünstigt wurde.

Collander und Holmström (1937) wiesen dann an den Blütenblättern der Darwin-Tulpe und *Hyacinthus candicans* nach, daß Sauerstoffmangel die Aufnahme von Orange G beeinflusst. „Es scheint somit sicher erwiesen, daß der Sauerstoffentzug tatsächlich eben die Aufnahme der Sulfosäurefarbstoffe seitens der sonst farbstoffaufnehmenden Zellen verhindert“ (S. 133). Die Abhängigkeit der Speicherung von Temperatur und Sauerstoffgehalt, die nie beobachtete Entfärbung der Vakuolen bei Übertragung der Schnitte in farbstofffreie Medien festigte bei den Verfassern die Ansicht, daß es sich bei der Aufnahme dieser Farbstoffe um einen Vorgang unter aktiver Beteiligung des Plasmas handelt, wofür Overton (1899) den Ausdruck „adenoide Tätigkeit“ und Höber (1926) den der „physiologischen Permeabilität“ geprägt hatten. Nach Collander stellt die adenoide Tätigkeit einen energetischen Prozeß dar, bei dem die zur Arbeitsleistung der Zelle nötige Energie aus der Atmung gewonnen wird.

Auch Drawert und Endlich (1955) fanden die Aufnahme saurer Farbstoffe in die Zellen verschiedener Blüten durch Narkotika und Sauerstoffentzug sistierbar. War während der Färbung bei ständigem Durchspülen der Farblösung mit reinem Stickstoff keine Farbstoffaufnahme erfolgt, so erreichte diese bei Durchleiten von Preßluft ihr Maximum. Am wenigsten empfindlich gegen die aufnahmehemmende Wirkung der verschiedenen Narkotika zeigten sich die Parenchymzellen um die Gefäßbündel. Die Färbung mit basischen Farbstoffen erwies sich dagegen von all diesen Faktoren als unabhängig. Drawert (1941, S. 59, 1955) deutet nun die adenoide Tätigkeit nicht energetisch, sondern chemisch, indem nicht die bei der Atmung entstehende Energie, sondern die im Stoffwechsel bestimmter Zellgruppen gebildeten Neben-, Zwischen- und Endprodukte, an die der Farbstoff gebunden wird, für die Aufnahme und Speicherung verantwortlich seien.

In den folgenden Versuchen wurden nur Schnitte aus der Mittelregion der Oberepidermis der zweiten Schuppe von außen verwendet. Nach fünf Minuten langer Färbung mit Uranin 1 : 10.000, pH 4,8 und genügendem Auswaschen in verdünntem Puffer wurden die Schnitte zur besseren Plasma-beobachtung plasmolysiert.

Das Protokoll eines sehr instruktiven Ausgangsversuchs sei hier wiedergegeben.

Versuch 116

6. II. 1959

- 15 h 10 Dem normal plasmolysierenden Schnitt mit konkaven Protoplasten wird seitlich am Deckglasrand ein Tropfen 0,2 mol Ammonkarbonatlösung zugesetzt. Nach kurzem Durchsaugen dehnen sich die der Zusatzstelle nächstgelegenen Protoplasten nach erfolgter Rundung sehr stark aus und stoßen beim Absterben das Uranin ab. Gegen das Schnittzentrum zu vermindert sich die osmotische Wirksamkeit der zugesetzten Lösung, die Plasmolyse geht nur langsam zurück, die Zellen sterben nicht sofort ab, nur die vorher streng auf das Plasma beschränkte Fluoreszenz vermindert sich und weicht

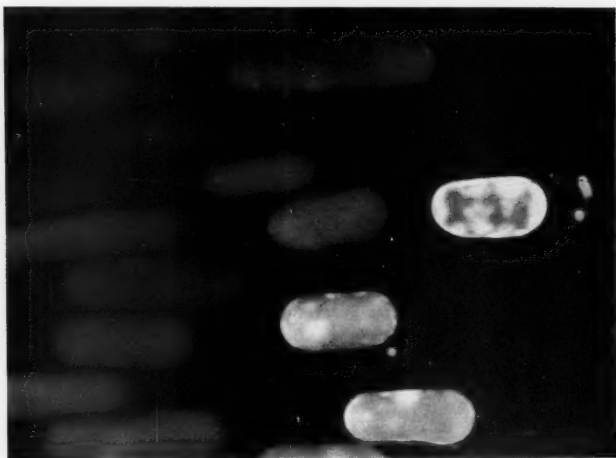


Abb. 4. Einwirkung 0,2 Mol Ammonkarbonat auf einen uraninfärbten, plasmolysierten Schnitt: Zellen mit Vakuolenkontraktion haben noch Plasmafluoreszenz, normale Zellen zeigen Umlagerung.

einer Diffusfärbung des ganzen Protoplasten. Während dieses Vorganges oder über diesen hinaus ändert sich die konkave bis krampfartige Plasmolyseform nach regelmäßig konvex.

- 15 h 48 Das Plasma der Randzellen, die eine durch den Schnitt bedingte Vakuolenkontraktion aufweisen, leuchtet noch eben so hell wie zu Versuchsbeginn (Abb. 4).
- 16 h 45 Ein Teil jener Randzellen ist abgestorben, bei den überlebenden Zellen geht die Plasmafluoreszenz in Diffusfärbung über, doch ist das Plasma leuchten noch immer sehr stark. Die übrigen Zellen sind in ihrer Diffusfärbung kaum verändert; sofern sie abgestorben sind, fehlt ihnen jede Fluoreszenz.

Während des Überganges von Plasma- zur Diffusfärbung konnten nun in einigen Zellen die von Küster (1927, 1932 a), Gieckhorn (1932) und Toth (1949) bei Plasmolyse beobachteten „Plasmaraketen“ nachgewiesen werden. Die stärkeren von ihnen zeigten deutliche Fluoreszenz, die dünnen fadenförmigen waren dagegen im UV-Licht kaum zu erkennen.

Unter der Ammonkarbonatwirkung verändert sich also die vom Uranin bewirkte krampfartige Plasmolyseform (Höfler, Ziegler und Luhan, S. 325) nach konvex, wobei die Plasmafluoreszenz einer Diffusfärbung weicht. Dieses Bild hatte nun eine starke Ähnlichkeit mit jenen Fällen, in denen der Farbstoff zur Vakuole hin abgegeben worden war.

Neuerliche Versuche, in denen die Lösung (0,2 Mol) sehr langsam, aber stetig durchgesaugt wurde, ließen schon klarer sehen. Das Ergebnis war im Prinzip gleich, doch konnte bei einigen Zellen während der langsam fortschreitenden Deplasmolyse der Absterbevorgang des Plasmas und der Übergang zu Tonoplastenplasmolyse beobachtet werden. So war bei manchen Zellen während der Rückdehnung eine deutliche Verhärtung des Plasmas an der Vakuolenkalotte zu verzeichnen. In diesem Zustand vermochte das Plasma nach geraumer Zeit der Vakuolenausdehnung nicht mehr zu folgen und wurde beim bruchsackartigen Hervorbrechen des Tonoplasten von diesem zur Seite gedrängt, wobei der noch im Plasma lokalisierte Farbstoff abgestoßen wurde. Die sich ausdehnende Vakuole behält ihre Fluoreszenz noch kurze Zeit bei, geht aber dann ebenfalls zugrunde.

In einem anderen Versuch erstreckte sich die Deplasmolyse mit Ammonkarbonat über zwei Stunden und dreißig Minuten. Die völlig ausgedehnten Protoplasten, noch mit kräftiger Diffusfärbung versehen, wurden kurz mit 0,8 mol Traubenzucker plasmolysiert, wobei sich nur mehr die Vakuolen verkleinerten, die aber kräftig tingiert blieben.

Läßt man nun auf einen normal gefärbten, plasmolysierten Schnitt nicht hypotonische Ammonkarbonatlösung einwirken, sondern überträgt ihn in eine fast isotonische Mischlösung von 8 cm³ 1,0 mol Traubenzucker und 2 cm³ 1,0 mol Ammonkarbonat, so tritt nur sofort Rundung der Protoplasten, aber keine Diffusfärbung ein.

Aus all diesen Versuchen geht also hervor, daß der Diffusfärbung eine Farbstoffverschiebung vom Plasma zum Zellsaft zugrunde liegt, die aber nur dann eintritt, wenn die Zellen wie bei der Deplasmolyse langsam absterben, während sie unter Beibehaltung des Plasmolysegrades in einer Mischlösung nicht zu bemerken ist. Die Randzellen mit Vakuolenkontraktion und stärkerer Fluoreszenz machen auch hier eine Ausnahme, indem sie den Farbstoff hartnäckiger im Plasma festhalten und offenbar langsamer absterben.

Bezüglich der Farbstoffumlagerung sind die Ausführungen Herčíks (1939) von Interesse, der mit K-Fluoreszein tingierte *Allium*-Epidermiszellen durch α -Strahlen langsam schädigte und dabei ebenfalls eine Umlagerung feststellen konnte. Diese Zellen wurden jedoch nach längerer oder kürzerer Zeit dieser Färbung verlustig und waren dann tot.

Es war nun noch zu klären, ob die Umlagerung hauptsächlich durch das langsame Absterben oder durch das Ammonkarbonat bewirkt wurde. Die Entscheidung brachten Plasmolyseversuche mit K-Rhodanidlösung, die nach Strugger (1932, 1949) sofort Konvexplasmolyse bewirkt, dann aber unter Quellungsdegeneration des Binnenplasmas in Tonoplastenplasmolyse überführt. Sofort nach dem Einlegen zeigten die Protoplasten bei perfekter Rundung starke Fluoreszenzverminderung, von der die Randzellen aber

weniger betroffen wurden. Nach dreißig Minuten war das Plasma völlig fluoreszenzfrei, nur die Vakuolen hatten noch sehr schwaches Leuchten, das aber stärker war als die Eigenfluoreszenz des nur KCNS-behandelten Schwesterschnittes und zugleich schwächer als bei der Umlagerung durch Ammonkarbonat.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß unter der Wirkung des Ammonkarbonats eine Umlagerung zu erreichen ist, wobei die Zellen aber langsam absterben. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen wird auch hier bei rascher Schädigung des Plasmas das Uranin abgestoßen.

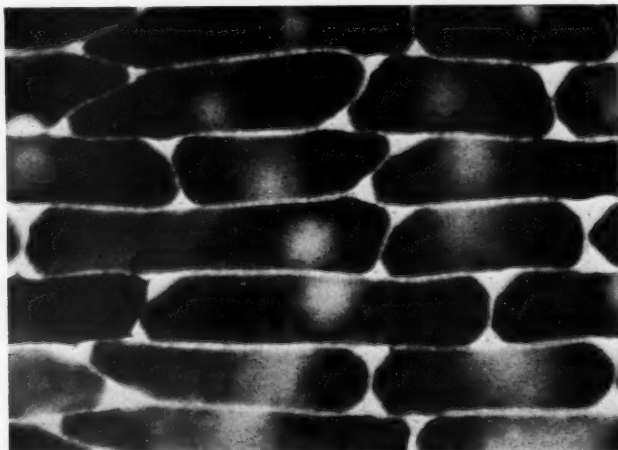


Abb. 5. Schnitt im Uranin 1 : 10.000, pH 4,8 vorgefärbt, sodann mit 0,2 Mol Ammonkarbonat behandelt: Kern und Plasma gequollen und fluoreszierend, Vakuole ungefärbt.

Da die Umlagerung bislang nur an während der Deplasmolyse absterbenden Zellen beobachtet worden war, so mußten die Verhältnisse auch bei unplasmolysierten Zellen geprüft werden. Von einem Versuch, in dem gefärbte Schnitte direkt in 0,2 mol Ammonkarbonatlösung übertragen wurden, sei hier ein Protokoll wiedergegeben.

Versuch 198

4. III. 1959

11 h 40 Dreißig Sekunden nach dem Einlegen in einen Tropfen 0,2 mol Ammonkarbonat: Die Plasmafluoreszenz ist unvermindert erhalten, doch sind die im uraningezeichneten Kontrollschnitt deutlichen Plasmastränge hier nicht mehr sichtbar. Die Kerne, im Hellfeld stark verquollen und völlig hyalin, erscheinen im Fluoreszenzbild als grelleuchtende, wohlgerundete Scheiben, deren Rand etwas schwächer leuchtet als ihr Zentrum.

11 h 42 Alle Zellen weisen nun mäßige Vakuolenkontraktion auf, ihre Kerne haben sich nicht mehr verändert.

- 11 h 52 Die Fluoreszenz ist unvermindert und noch immer auf Kern und Plasma beschränkt. Die Vakuolen sind kontrahiert und heben sich in ihrer Fluoreszenzlosigkeit deutlich vom Plasma ab (Abb. 5).
- 11 h 58 Nach zwei Minuten langem Verweilen in 0,8 mol Traubenzucker sind neunundneunzig Prozent aller Zellen abgestorben und zeigen nur mehr Tonoplastenplasmolyse. Die Plasmafluoreszenz ist verschwunden, die Vakuolen leuchten noch kräftig. Nur drei Zellen sind normal konvex, ihr Plasma fluoresziert noch unvermindert hell.

Die Zellen zeigen hier also keine Umlagerung, sondern es kommt zu Vakuolenkontraktion, die offenbar vorerst eine Umlagerung unterbindet.



Abb. 6. Umlagerung unter 0,005 Mol Ammonkarbonat: Plasma fluoreszenzfrei — Vakuolenfärbung.

Erst nachfolgende Plasmolyse ermöglicht beim Absterben des Plasmas eine Farbstoffverschiebung zur Vakuole, die bei normaler Plasmolyse unterbleibt.

Diese Versuche wurden mit niedrigeren Konzentrationen fortgesetzt. Wie bei 0,2 mol verhielten sich auch die Präparate bei 0,1 mol, nur waren die Kerne und das Plasma nicht mehr so stark gequollen, doch waren auch hier bei nachfolgender Plasmolyse fast alle Zellen abgestorben. Ähnlich lagen die Verhältnisse bei 0,05 mol, wo die Kerne nach zehn Minuten schwache Verquellung zeigten und die Vakuolenkontraktion nur auf einige Zellen beschränkt war. Bei Plasmolyse starben in den verschiedenen Schnitten keine oder bis zu einem Drittel der Zellen ab.

In den drei nächst niedrigeren Konzentrationsstufen (0,01, 0,005, 0,001 mol) wurden die tingierten Schnitte für zwölf Minuten in das Fläschchen mit der jeweiligen Lösung übertragen und hierauf fluoreszenzoptisch untersucht. Das Ergebnis war verblüffend.

Versuch 209

5. III. 1959

13 h 45 Zwei von drei Schnitten zeigen nach zwölf Minuten langem Verweilen in 0,005 mol Ammonkarbonat (pH 9,05 gemessen mit Glaselektrode) in allen Zellen Diffusfärbung von grünem Farbton. Die Zellwände, völlig fluoreszenzfrei, heben sich als schwarze Raster deutlich gegen die Umgebung ab. Im dritten Schnitt zeigen einige Randzellen mit schwacher Vakuolenkontraktion neben der Diffusfärbung noch deutliche Plasmafluoreszenz.

13 h 50 Nach zwei Minuten dauernder Plasmolyse mit 0,8 mol Traubenzucker sind die Protoplasten konkav, die Diffusfärbung ist erhalten geblieben.

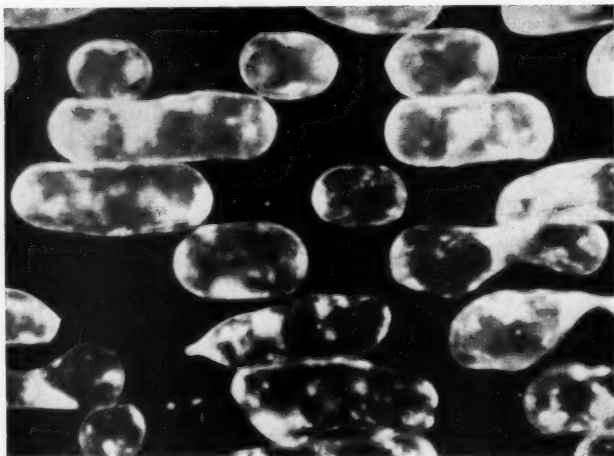


Abb. 7. Derselbe Schnitt wie in Abb. 6 nach Plasmolyse in 0,5 Mol KNO_3 : Vakuolen entfärbt — Plasmafluoreszenz ist wieder zurückgekehrt.

14 h 00 Nach abermaligem Aufenthalt im Plasmolytikum ist jetzt wieder deutliche Plasmafluoreszenz zu sehen, die Diffusfärbung ist völlig verschwunden.

Die schwache Ammonkarbonatlösung verursachte also diffuse Färbung, die sich in der nachfolgenden Plasmolyse, bei der keine Zellen mehr absterben, als reversibel erwies. Diese Zellen zeigten auch ganz normale Plasmaströmung (vgl. Abb. 6 und 7).

Noch niedrigere Konzentrationen (0,0005 und 0,0001 mol) riefen an tingierten Schnitten keinerlei Veränderungen mehr hervor: Die Plasmafluoreszenz blieb erhalten und die Zellen unterschieden sich durch nichts von denen des Kontrollschnittes.

Die Diffusfärbung, der eine Umlagerung zugrunde liegt, wurde noch weiter untersucht. Für das Wiedererscheinen der Plasmafluoreszenz unter gleichzeitiger Entfärbung der Vakuolen möchte ich in den weiteren Ausführungen den Ausdruck „Rücklagerung“ verwenden.

Die Hauptbedeutung beim Zustandekommen dieser Erscheinungen darf wohl dem aus der hydrolysierenden Ammonkarbonatlösung stammenden

Ammoniak² zugeschrieben werden, das wie seit de Vries (1871) bekannt, das Plasma sehr schnell durchsetzt und für das Collander, Turpeinen und Fabritius (1931) an *Rhoeo*-Zellen eine Permeationskonstante, die zwischen 200 und 2000 liegt, bestimmten. Bei der Umlagerung würde demnach die Ammoniakpermeation so lange andauern, bis das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Vakuole und Außenmedium erreicht ist. Bei der Rücklagerung würde der Vorgang nur mit verändertem Vorzeichen ablaufen.

Würde nun bei nachfolgender Plasmolyse dem Plasmolytikum dieselbe Ammoniakkonzentration verliehen, die jene Lösung hatte, in der die

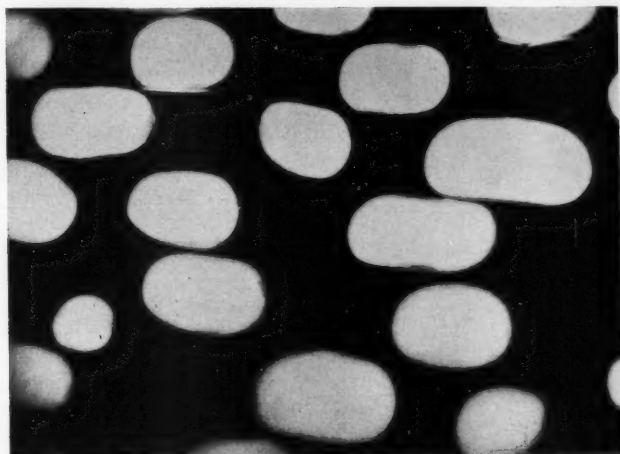


Abb. 8. Zellen mit Umlagerung behalten diese bei Plasmolyse mit NH_3 -haltigem Plasmolytikum bei.

Schnitte umgelagert hatten, dann mußte, sofern das Konzentrationsgefälle von ausschlaggebender Bedeutung war, die Vakuolenfärbung erhalten bleiben. In diesem Sinne wurden Lösungen von 1,0 mol K-Chlorid und 0,01 mol Ammonkarbonat zu gleichen Volumsteilen gemischt und das pH mit 8,8 bestimmt (gemessen mit Glaselektrode). Schnitte mit vollkommener Umlagerung wurden nun zehn Minuten in dieser Lösung belassen und hierauf untersucht. Das Ergebnis war wie zu erwarten: Alle Zellen sind ideal konvex plasmolysiert, das Plasma ist völlig fluoreszenzfrei und streng gegen die Vakuole abgegrenzt. Besonders deutlich war dies an Teilprotoplasten zu sehen, auf deren Vakuolenkalotte noch ein Plasmazipfel aufsaß. (Vgl. Abb. 8 und 9). An diesem Bild hatte sich auch nach einstündigem Aufenthalt

² Ich danke Herrn Doz. Kinzel für folgende Angabe: Bei pH 9,25 enthalten Lösungen von Ammonsalzen 50% NH_4 -Ionen und 50% freies NH_3 , bei pH 9,0 ... 64,16% NH_4 -Ionen und 35,84% NH_3 , bei pH 8,8 ... 73,94% NH_4 -Ionen und 26,06% NH_3 . Aus den jeweils angegebenen molaren Konzentrationen für $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ und den pH-Werten läßt sich aus diesen Daten leicht die jeweilige Konzentration an freiem Ammoniak berechnen.

in der Mischlösung nichts geändert. Werden solche Schnitte hierauf in eine fast isotonische KCl-Lösung übertragen, so zeigt sich nach kurzer Zeit auch hier die Rücklagerung als perfekt, indem das Plasma normal, die Vakuolen aber nicht mehr fluoreszieren.

Damit scheint das Konzentrationsgefälle für Ammoniak zwischen Vakuole und Außenmedium für die Farbstoffverschiebungen primär von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Daß aber auch das Plasma mitbestimmend sein muß, geht aus der Tatsache hervor, daß bei der Rücklagerung nie ein Farbstoffaustritt aus der

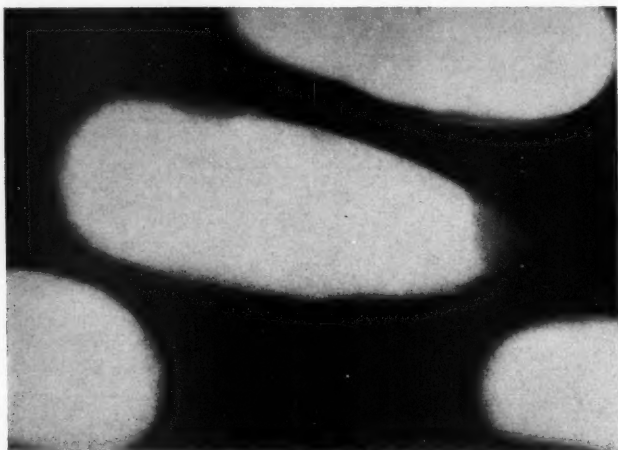


Abb. 9. Eine Zelle desselben Schnittes wie in Abb. 8: Plasma und Kern fluoreszenzfrei, Vakuole gefärbt.

Zelle beobachtet werden konnte. Wäre außerdem das Konzentrationsgefälle allein maßgebend, so wäre zu erwarten gewesen, daß Zellen, die rückgelagert hatten, durch neuerliches Übertragen in die Mischlösung zu einer zweiten Umlagerung bewogen werden müßten. Dies ließ sich aber in den entsprechenden Versuchen nicht erreichen, vielmehr blieb die bei der Rücklagerung wieder erlangte Plasmafluoreszenz auch bei längerem Verweilen in der Mischlösung hartnäckig erhalten. Dasselbe zeigte sich auch, wenn tingierte Schnitte ohne jegliche Vorbehandlung in die Mischlösung gebracht wurden. Bereits nach zehn Minuten waren alle Protoplasten schön konvex, von einer Vakuolenfluoreszenz war nichts zu bemerken.

Bisher war die Rücklagerung nur bei Plasmolyse beobachtet worden, doch mußte sie auf Grund obiger Überlegungen auch in Leitungswasser zu erzielen sein. Dies fand sich auch bestätigt, nur verlief der Vorgang hier langsamer als bei Plasmolyse. Noch nach zwanzig Minuten langem Wässern zeigten die Schnitte neben der bereits wieder fast normalen Plasmafluoreszenz noch geringe Vakuolenfärbung, während diese beim plasmolysierten Kontrollschnitt bereits nach zehn Minuten verschwunden war. Wässerte ich

die Schnitte aber bis zu zwei Stunden, so war die Fluoreszenz der Vakuolen gegenüber der des Plasmas bedeutend stärker und durch einen satten Olivton gekennzeichnet. Dieser Farbton charakterisiert indes jene Zellen, deren Plasma bei mehrstündigem Wässern, wie dies Döring und später Höfler, Ziegler und Luhan beobachteten, den Farbstoff nach der Vakuole hin abgegeben hat. Da die unter Ammoniakwirkung eintretende Vakuolenfärbung aber durch einen grünen Fluoreszenzton ausgezeichnet ist, so konnte das bei zweistündiger Rücklagerung erhaltene Bild nur so gedeutet werden, daß der Farbstoff wohl in das Plasma zurückgekehrt sein muß, dann aber unter der Wirkung des Wässerns abermals in die Vakuole gelangt war.

In Leitungswasser rücklagernde Zellen vermochten nun im Gegensatz zu den plasmolysierten Präparaten unter neuerlichem Bad in 0,005 mol Ammonkarbonat ein zweitesmal umzulagern. Die neuerliche Rücklagerung nach Übertragung der Schnitte in Leitungswasser verlief abermals verzögert, wobei die Grenzen zwischen ihr und der normalen Umlagerung immer mehr verschwammen. Plasmolysiert man nun jene Schnitte, so verstärkt sich wohl die Plasmafluoreszenz durch den aus der Vakuole tretenden Farbstoff, die Vakuolen werden aber nie mehr fluoreszenzfrei. Dieser Versuch zeigt zwei wichtige Tatsachen, daß nämlich bei Plasmolyse nur jener Teil des Farbstoffes ins Plasma zurückkehrt, der grün fluoresziert, während der oliv fluoreszierende Teil in der Vakuole festgehalten wird. Außerdem unterstreicht die im Leitungswasser erreichte und unter Ammoniakwirkung abermals verdrängbare Plasmafluoreszenz die umlagerungshemmende Wirkung der Plasmolyse.

Noch offen war die Frage nach Schädlichkeit der Ammonkarbonatlösung in dieser Konzentration. Zu ihrer Klärung wurden zehn Schnitte, die vorher gefärbt worden waren, vierundzwanzig Stunden in der Lösung belassen und dann untersucht. Der Farbton der Vakuolen war grün und das Plasma fluoreszenzfrei. Bei nachfolgender Plasmolyse kontrahieren wohl alle Protoplasten, doch zeigt ein Großteil konkav-krampfge, wenige dagegen schön konvexe Form. Auch der Rücklagerungsvorgang ist verzögert. Nach zehn Minuten war der Farbstoff noch teilweise in der Vakuole. Erst nach dreißig Minuten war diese vollkommen dunkel und das Plasma fluorochromiert, sofern die Zellen plasmolysiert worden waren. Daraus geht wohl eindeutig hervor, daß diese Konzentration kaum einen schädigenden Einfluß, speziell in den in Frage stehenden Versuchen, ausüben konnte.

Bereits oben wurde auf die verschiedene Vakuolenfarbe bei normaler, in Leitungswasser erfolgender und durch Ammonkarbonatlösung induzierter Umlagerung hingewiesen. Wie bei Döring konnte auch in diesen Versuchen aus olivgefärbten Vakuolen kein Farbstoff mehr austreten, solange die Zellen noch am Leben waren. Auch Einwirkung von hochkonzentrierten Ammonkarbonatlösungen und nachfolgende Plasmolyse vermochten an dieser Tatsache nichts zu ändern.

Es erscheint nun wohl berechtigt, für die von Döring und Höfler, Ziegler und Luhan beobachtete Umlagerung und die unter Ammon-

karbonatwirkung erfolgende, verschiedene Mechanismen anzunehmen, da sich gezeigt hat, daß sich die Vorgänge in wesentlichen Zügen unterscheiden. Während die Umlagerung in Leitungswasser mehrere Stunden in Anspruch nimmt, ist sie unter Einfluß des Ammonkarbonats bereits nach zehn Minuten perfekt und die Vakuolen zeigen dann ein der Plasmafluoreszenz nahestehendes Grün, während sie im ersteren Falle einen satten Olivton aufweisen. Ist die grüne Vakuolenfärbung bei Übertragung der Schnitte in ammoniakfreies Medium reversibel, indem sie in Plasmafluoreszenz übergeht, stellt die durch Olivfärbung gekennzeichnete Umlagerung einen unverrückbaren Endzustand dar. Im folgenden seien beide Vorgänge für sich getrennt besprochen.

Bei der normalen Umlagerung im Leitungswasser ist wohl am auffälligsten die Tatsache, daß, wie auch von einigen in der Vakuole gespeicherten Sulfosäurefarbstoffen bekannt (Collander 1921, Collander und Holmström 1937, Drawert 1941, 1950 a, 1955, Bauch 1949 u. a.), niemals eine Entfärbung der Vakuolen beobachtet werden konnte, solange die Zellen am Leben waren. Auch Einwirkung von Ammonkarbonat änderte daran nichts. Dieses Verhalten und die Verschiebung des Farbtones sprechen wohl berechtigt für eine chemische Veränderung des Farbstoffs, vielleicht in Form einer Bindung an irgendwelche Stoffe, wodurch ein nicht permeierfähiges Produkt entsteht. Vielleicht läßt sich Drawerts Annahme einer Bindung des Farbstoffs an Neben-, Zwischen- und Endprodukte des Stoffwechsels auch auf diesen Fall ausdehnen. Jedenfalls liegt Metabolie vor.

Anders sind die Verhältnisse bei der Umlagerung unter dem Einfluß schwach konzentrierter Ammonkarbonatlösungen. Damit es überhaupt zu einer Plasmaentfärbung kommen kann, muß die in ihrer Natur noch unerkannte Bindung des Farbstoffs an das Plasma gelöst werden. Wodurch wird aber der Farbstoff zur Abwanderung nach der Vakuole veranlaßt? Wie wir von der Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen wissen, kann für deren Speicherung in der Vakuole einmal die Anwesenheit farbstoffaffiner Substanzen verantwortlich sein. Die Tatsache, daß die Vakuolenfärbung in unserem Falle aber nach Übertragung der Schnitte in ammoniakfreie Medien reversibel ist, indem der Farbstoff in das Plasma zurückkehrt, macht einen Speichermechanismus, wie er den „vollen“ Zellsäften (Höfler 1947, Kinzel 1959) zukommt, unwahrscheinlich. Drawert (1948) mißt dagegen bezüglich der Aufnahme basischer Farbstoffe der pH-Differenz zwischen Farbbad und Vakuole größte Bedeutung bei, und zwar permeiere der Farbstoff immer dahin, wo für ihn die günstigsten Verhältnisse für die Dissoziation bestehen. „Für saure Farbstoffe gilt natürlich dasselbe bei entgegengesetztem cH-Gefälle“ (1950 b, S. 86). Das würde für die Uraniumlagerung bedeuten, daß der Zellsaft durch die vom permeierten Ammoniak herührende alkalische Reaktion für das saure Uranin „schmackhafter“ geworden ist, was zum Übertritt des Farbstoffs aus dem Plasma in die Vakuole und damit zur Plasmaentfärbung Anlaß gibt. Es würde sich nach dieser Vorstellung also um einen Mechanismus handeln, ähnlich dem bekannten Ionenfallenmechanismus bei der Färbung „leerer“ Zellsäfte (Höfler 1947, Kinzel 1954), nur wären die Vorzeichen sozusagen

vertauscht: Das Uranin würde in den durch das Ammoniak alkalisch gewordenen Zellsaft eintreten und dort dissoziieren, solange für eintretende Moleküle ein Konzentrationsgefälle erhalten bleibt. Wenn das Ammoniak aus dem Zellsaft exosmiert und dieser wieder neutrale oder schwach saure Reaktion annimmt, würden die Voraussetzungen für die Anionenspeicherung wieder aufhören; der Farbstoff würde zum Teil zu Molekülen kondensieren, die sich im Plasma lösen und dort wieder gebunden werden. So würde sich die von mir erstmals beobachtete Rücklagerung verstehen lassen, bei welcher der aus der Vakuole tretende Farbstoff vom Binnenplasma abgefangen und wieder gespeichert wird.

Was besagt nun noch die Tatsache, daß bei prämortaler Plasmaquellung, ausgelöst durch Ammonkarbonat, und bei Plasmolyse keine Umlagerung erfolgt? Offenbar ist hier in beiden Fällen die Bindung Farbstoff—Plasma verstärkt, was möglicherweise auf einer Änderung der innerplasmatischen Struktur beruhen könnte.

5. Zusammenfassung

1. Vorbehandlung mit Ammonkarbonat vermindert bei steigender Konzentration und Einwirkungsdauer die Fluorochromierbarkeit des *Allium*-Plasmas, die unter vitalen Verhältnissen bis auf Eigenfluoreszenz herabgedrückt werden kann.

2. Die Herabsetzung der Tingierbarkeit ist unter gleichen Verhältnissen in den einzelnen Schuppenregionen verschieden: Die Zellen der Basis sprechen auf die verminderte Wirkung des Agens weniger stark an als die Zellen der Schuppenmitte oder -spitze. Zwischen letztgenannten Bereichen ist der Unterschied bezüglich der Speicherfähigkeit weniger ausgeprägt als zwischen Basis und Mitte.

3. Durch die Ammonkarbonatlösung geschädigte Zellen speichern in prämortalem Zustand stärker, als nach der Konzentration zu erwarten gewesen wäre.

4. Zellen des Schnitttrandes mit traumatisch bedingter Vakuolenkontraktion werden in ihrer Speicherfähigkeit durch schwache Ammonkarbonatlösungen weniger beeinträchtigt als normale Zellen.

5. Einwirkung von Ammonkarbonat in Konzentrationen, die noch Vakuolenkontraktionen auszulösen vermögen, bewirkt an gefärbten und plasmolysierten Schnitten während des langsam eintretenden Zelltodes bei Deplasmolyse eine Umlagerung des Farbstoffs vom Plasma nach der Vakuole. Bei unplasmolysierten Zellen tritt dagegen Plasmaquellung ein, von Vakuolenfärbung ist nichts zu bemerken. Erst bei nachfolgender Plasmolyse, bei der sich nur mehr die Tonoplasten kontrahieren, erfolgt auch hier Umlagerung.

6. Umlagerung läßt sich ferner unter vitalen Verhältnissen durch Einwirkung 0,01 bis 0,001 Mol Ammonkarbonatlösung innerhalb weniger Minuten erreichen. Diese zeigt sich bei Übertragung der Schnitte in ammoniakfreie Medien, in Plasmolytikum oder Leitungswasser, als reversibel, indem sich die Vakuolen entfärben und die Plasmafluoreszenz wieder zurückkehrt.

7. Erfolgt diese Rücklagerung in Leitungswasser, so ist durch neuerlichen Zusatz von Ammonkarbonat genannter Konzentration abermals eine Vakuolenfärbung zu erzielen. Wurde aber die Rücklagerung durch ein ammonkarbonatfreies Plasmolytikum (KNO_3 oder Traubenzucker) bewirkt, so läßt sich durch Übertragung in ein gleich starkes, aber ammonkarbonathaltiges Plasmolytikum keine abermalige Umlagerung erreichen.

8. Für die bei mehrstündigem Wässern erfolgende Umlagerung und die durch Ammonkarbonat induzierte werden verschiedene Mechanismen angenommen. Im ersten Fall wäre eine Bindung an Stoffwechselprodukte, wie dies Drawert (1941) für saure Farbstoffe annimmt, denkbar, worin auch die Verschiebung des Farbtones nach Oliv begründet sein könnte.

9. Für die reversible Umlagerung, die durch ein der Plasmafluoreszenz nahestehendes Grün der Vakuolen gekennzeichnet ist, wird ein Vorgang angenommen, der dem bekannten Ionenfallenmechanismus Höflers (1947) ähnlich ist: Nach Lösung der Bindung Plasma—Farbstoff, wandert das saure Uranin in den durch permeiertes Ammoniak alkalisierten Zellsaft und zerfällt hier in Ionen, wobei sich unter Aufrechterbleiben eines Konzentrationsgefälles für die Farbmoleküle das Plasma entfärbt. Bei Ammoniakexosmose in ammoniakfreien Medien kondensieren die Farbionen zu Molekülen, die sich nun ins Plasma hineinlösen und hier abermals gespeichert werden.

Literatur

- Allen, P. J., and W. H. Price, 1950: The relation between respiration and protoplasmic flow in the slime mold, *Physarum polycephalum*. Amer. J. Bot. 37, 393.
- Bancher, E., 1958: Mikrurgische Untersuchungen an pflanzlichen Zellkernen. I. Wirkungen von Elektrolyt- und Zuckerlösungen auf Karyotin und Karyolymphe. Biol. gen. 14, 293.
- Bauer, L., 1949: Über den Wanderungsweg fluoreszierender Farbstoffe in den Siebröhren. Planta 37, 221.
- 1953: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta 42, 367.
- Bethe, A., 1922: Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Permeabilität toter Membranen, auf die Adsorption an Eiweißsolen und auf den Stoffaustausch der Zellen. Biochem. Z. 127, 18.
- Collander, R., 1921: Über die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. Jb. wiss. Bot. 60, 354.
- O. Turpeinen und E. Fabritius, 1931: Die Permeabilität der *Rhoeo*-Zellen für Ammoniak und Essigsäure. Protoplasma 13, 348.
- und A. Holmström, 1937: Die Aufnahme von Sulfosäurefarbstoffen seitens pflanzlicher Zellen — ein Beispiel der adenoiden Tätigkeit der Protoplasten. Acta Soc. Fauna et Flora Fenn. 60, 129.
- Darwin, Ch., 1876: Insectenfressende Pflanzen. Stuttgart.
- Döring, H., 1955: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. dtsh. bot. Ges. 53, 415.
- Drawert, H., 1941: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 135, 21.

- Drawert, H., 1948: Desgl. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch. 3 b, 111.
- 1950 a: Das Solfonamid Protosil solubile als Vitalfarbstoff. Protoplasma 39, 688.
- 1950 b: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. Protoplasma 40, 85.
- 1952 a: Die Eigenfluoreszenz der Schuppenblattepidermen von *Allium cepa* L. und ihre Beeinflussung. Z. Bot. 40, 407.
- 1952 b: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat. Ber. dtsh. bot. Ges. 65, 263.
- 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 134.
- 1955: Die vitale Fluorochromierung der Sphärosomen (Mikrosomen) mit einem aliphatisch in N substituierten Aminopyren. Naturw. 42, 419.
- und B. Endlich, 1955: Der Einfluß von Sauerstoff und Atmungsgiften auf die Aufnahme und Speicherung saurer und basischer Farbstoffe durch die lebende Pflanzenzelle. Protoplasma 46, 170.
- Germ, H., 1952: Untersuchungen über die systrophische Inhaltsverlagerung in Pflanzenzellen nach Plasmolyse. Protoplasma 14, 566.
- Gicklhorn, J., 1932: Intracelluläre Myelinfiguren und ähnliche Bildungen bei der reversiblen Entmischung des Protoplasmas. Protoplasma 15, 90.
- Hanstein, J. v., 1880: Einige Züge aus der Biologie des Protoplasmas. Botan. Abhandlungen a. d. Gebiet d. Morphologie und Physiologie 4, Heft 2, Bonn.
- Henner, J., 1954: Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. Protoplasma 21, 81.
- Herčík, F., 1959: Die fluoreszenzoptische Analyse der α -Strahlenwirkung. Protoplasma 52, 527.
- Höber, R., 1926: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 6. Auflage Leipzig.
- Höfler, K., 1954: Kappenplasmolyse und Salzpermeabilität. Z. Mikrosk. 51, 70.
- 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
- 1957: Mikrosomen und Meiosomen. Protoplasma 48, 167.
- und D. Düvel, 1954: Helgoländer Algen im Fluoreszenzmikroskop. Ber. dtsh. bot. Ges. 67, 2.
- W. Url und A. Diskus, 1956: Zellphysiologische Beobachtungen und Versuche an Algen der Lagune von Venedig. Boll. Museo Civico Venezia, Vol. IX, 63.
- A. Ziegler und M. Luhan, 1956: Fluorochromierungsstudien mit Uranin. Protoplasma 46, 322.
- Hofmeister, W., 1867: Die Lehre von der Pflanzenzelle. Leipzig.
- Houska, H., 1939: Zur protoplasmatischen Anatomie der Küchenzwiebel. Österr. Bot. Z. 88, 161.
- 1941: Beiträge zur Kenntnis der Kappenplasmolyse. Protoplasma 36, 11.
- Huber, B., und K. Höfler, 1950: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Jb. wiss. Bot. 75, 351.
- Kinzel, H., 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. Protoplasma 44, 52.
- 1959: Über Gesetzmäßigkeiten und Anwendungsmöglichkeiten der Zellsaft-Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen. Ber. dtsh. bot. Ges. 72, 253.
- Klemm, P., 1895: Desorganisationserscheinungen der Zelle. Jb. wiss. Bot. 28, 627.
- Küster, E., 1912: Über die Aufnahme von Anilinfarben in die lebende Pflanzenzelle. Jb. wiss. Bot. 50, 261.

- Küster, E., 1924: Experimentelle Physiologie der Pflanzenzelle. Abderhaldens Handb. d. Biol. Arbeitsmeth. Abt. XI, Teil 1, Heft 7, Lief. 154, 961.
- 1927: Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. *Protoplasma* 1, 75.
- 1929: Beobachtungen an verwundeten Zellen. *Protoplasma* 7, 150.
- 1932 a: Über Protoplasmatentakeln und Vakuolenzerklüftung. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 50, 125.
- 1932 b: Über die Bildung semipermeabler Kernmembranen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 50, 350.
- 1935: Die Pflanzenzelle. Jena.
- Lepeschkin, W. W., 1925: Über den Aggregatzustand der protoplasmatischen Fäden und Stränge der Pflanzenzelle. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 43, 21.
- Milovidov, F., 1949: Physik und Chemie des Zellkerns. *Protoplasma Monographien*, Bd. 20, Berlin.
- Mix, M., 1958: Zum Mechanismus der Sphärosomenfluoreszenz mit Oxazinen und anderen basischen Farbstoffen. *Protoplasma* 50, 454.
- Overton, E., 1899: Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Vjschr. Naturforsch. Zürich* 44, 88.
- 1900: Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. *Jb. wiss. Bot.* 54, 669.
- Perner, E. S., 1952: Die Vitalfärbung mit Berberinsulfat und ihre physiologische Wirkung auf Zellen höherer Pflanzen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 65, 52.
- 1953: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 42, 457.
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* 2, 179.
- Pringsheim, N., 1897: Über Lichtwirkung und Chlorophyllfunction in der Pflanze. *Jb. wiss. Bot.* 12, 288.
- Rhode, K., 1917: Untersuchungen über den Einfluß der freien H-Ionen im Inneren lebender Zellen auf den Vorgang der vitalen Färbung. *Pflügers Archiv* 168, 411.
- Rouschal, E., 1941: Untersuchungen über die Protoplasmatik und Funktion der Siebröhren. *Flora* 155, 155.
- Ruhland, W., 1909: Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. *Jb. wiss. Bot.* 46, 1.
- 1912: Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. *Jb. wiss. Bot.* 51, 376.
- 1913: Zur Kenntnis der Rolle des elektrischen Ladungssinnes bei der Kolloidaufnahme durch die Plasmahaut. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 31, 304.
- Scarath, G. W., 1927: The influence of external osmotic pressure and of disturbance of the cell surface on the permeability of *Spirogyra* for acid dyes. *Protoplasma* 1, 204.
- Scheidl, W., 1954: Auslösung von Vakuolenkontraktion durch undissoziierte Basen. *S. B. Österr. Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl., I*, 163, 645.
- Schindler, H., 1958: Tötungsart und Absterbebild I. Der Alkalitod der Pflanzenzelle. *Protoplasma* 50, 186.
- Schumacher, W., 1955: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. *Jb. wiss. Bot.* 77, 685.
- 1956: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Haaren von *Cucurbita Pepo*. *Ebenda* 82, 507.
- 1957: Weitere Untersuchungen über die Wanderung von Farbstoffen in den Siebröhren. *Ebenda* 85, 422.
- Strohmeyer, G., 1935: Beiträge zur experimentellen Cytologie. *Planta* 24, 470.

- Strugger, S., 1929: Beitrag zur Kolloidchemie des pflanzlichen Ruhekernes. *Protoplasma* 10, 365.
- 1932: Über Plasmolyse mit Kaliumrhodanid. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 50, 24.
- 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 26, 56.
- 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora* 132, 233.
- 1939: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 2. Die Eigenschaften des Berberinsulfats und seine Speicherung durch lebende Zellen. *Biol. Zbl.* 59, 274.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Auflage, Berlin.
- Toth, A., 1949: Quantitative Untersuchungen über die Wirkungen der UV-Strahlung auf die Plasmapermeabilität. *Österr. bot. Z.* 46, 161.
- Vries de, H., 1871: Sur la perméabilité du protoplasme des betteraves rouges. *Arch. néer.* 6, 117 und *Opera e periodicis coll.* 1, 86.

Wärmebewegungen beim Koazervationsprozeß

Von

Wilhelm Linke

Humboldt-Universität, Institut für Allgemeine Biologie, Berlin

(Direktor: Prof. Dr. J. Segal)

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. August 1959)

Das wachsende Interesse, das in den letzten Jahrzehnten der Kolloidforschung gewidmet wurde, ging nicht nur von der Chemie, sondern auch von der Biologie aus. Der Biologie ging es dabei besonders um ein kolloidales System, und zwar um das Protoplasma. Schien doch die Kolloidforschung den Schlüssel für seine Struktur anzubieten. Von der Aufdeckung dieser Struktur aber erwartete man nicht mit Unrecht weitgehende Einblicke in das Wesen der Lebensvorgänge. Unter anderen hatten bereits Berthold (1886), Bütschli (1892), Fischer (1899), Ružička (1907) und Lepeschkin (1937) [2] Theorien über die Struktur des Protoplasmas aufgestellt. Einen ganz besonderen Auftrieb erhielt diese Forschungsrichtung jedoch mit der Einführung des Begriffs der „Koazervation“ durch Bungenberg de Jong (1930) [1].

Bungenberg de Jong charakterisiert diese Struktur, indem er schreibt: „Die Koazervate sind also gewissermaßen als eine besondere Kategorie von konzentrierten Solen aufzufassen, nämlich als solche, die mit Flüssigkeiten — die sich im Gleichgewicht mit dem jeweiligen kapillarchemischen Zustand der Kolloidteilchen befinden — nicht mischbar sind.“

An sich war auch dieses Phänomen nicht völlig neu. Zum Beispiel hatte schon Ostwald [5] offenbar Beobachtungen in dieser Richtung gemacht. Verdienst Bungenberg de Jongs aber ist es:

1. erkannt zu haben, daß die Koazervation nicht eine beliebige Entmischungerscheinung, sondern ein Zusammenwirken von Grenzbedingungen ist, durch das ein Zustand mit neuen eigenen Gesetzmäßigkeiten entsteht;
2. von Anfang an auf die Perspektiven hingewiesen zu haben, die dieser Zustand für die Biologie eröffnet.

Er selbst hat sie vor allem 1932 [1] in seinem „Sammelreferat“ herausgearbeitet. Seitdem ist die weitere Bearbeitung dieser biologischen Perspektiven mehr oder weniger parallel zur Erforschung des Koazervatzustandes verlaufen, wenn sie auch bei den Biologen bei weitem nicht die allgemeine Beachtung gefunden haben, die sie verdienen.

Vor allem erwies die Koazervation ihre Fruchtbarkeit für die Biologie, als Oparin [4] den Koazervatzustand in seine Theorie von der Entstehung des Lebens auf der Erde einbezog.

Einen weiteren bedeutenden Fortschritt in der Erforschung ihrer Gesetzmäßigkeiten verdankt die Koazervation dem sowjetischen Forscher Troschin [7]. Er griff auf die Hinweise Bungenberg de Jongs zurück, das Permeabilitätsproblem durch die Annahme, daß sich das Protoplasma im Koazervatzustand befinde, zu deuten. Seine Experimente bewiesen, daß die Auffassung von der Koazervatnatur des nichterregten Protoplasmas die zur Zeit am besten begründete Erklärung für die Protoplasmadynamik bietet. Auf der gleichen Vorstellung aufbauend, entwickelte Segal [6] seine umfassende Theorie von der Erregbarkeit der lebenden Materie.

Um diese Bedeutung des Koazervatzustandes verständlich zu machen, soll zunächst der Prozeß, der zur Koazervation der nativen Proteine führt, näher beschrieben werden. Wir gehen dabei vom Komplexkoazervat ampholytischer Moleküle Bungenberg de Jong [1] aus.

Als wesentlichste Voraussetzung für die Koazervation wird dabei die Beseitigung des kolloidalen Wassermantels bezeichnet. Dieser Wassermantel beruht auf der Wechselbeziehung zwischen der elektrischen Ladung des Kolloids und der der Wasserphiole. Er ist deshalb von Natur aus besonders gering im isoelektrischen Punkt ausgebildet. Der isoelektrische Punkt — besser der isoelektrische Bereich — ist dadurch gekennzeichnet, daß positive und negative Ladungen des Kolloids einander ausgleichen. Deshalb werden hier nach außen hin keine elektrostatischen Anziehungskräfte, die Wasserteilchen binden könnten, wirksam. Dieses Zurücktreten des Wassermantels ermöglicht einen besonders

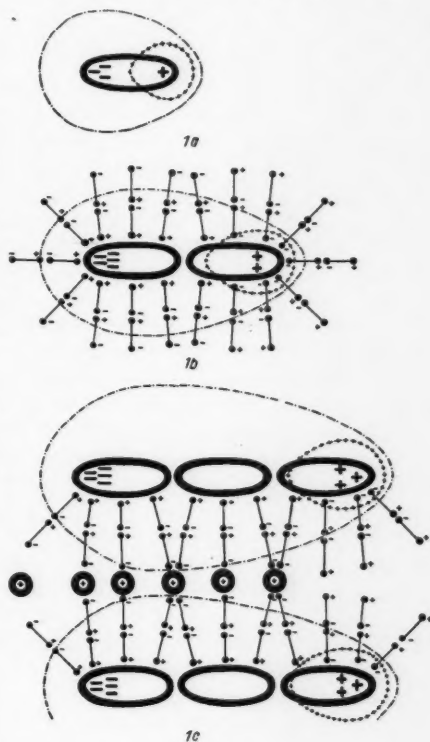


Abb. 1.

engen Kontakt der Kolloide. Die Folge ist eine *Ausflockung* der Kolloide. Im neutralen pH-Bereich dagegen besitzt beispielsweise das Globulinmolekül einen negativen Ladungsüberschuß (Abb. 1 a). Das negative elektrische Feld muß also stärker sein als das positive. Da die Schwerpunkte beider Ladungen räumlich dicht beieinander liegen, wird das negative das positive umhüllen. Die Moleküle zeigen also alle nach außen negative Ladungen und stoßen sich deshalb gegenseitig ab. Es ist natürlich möglich, daß durch summierte thermische Stöße ein Molekül so viel kinetische Energie aufnimmt, daß es den negativen Ladungswall eines anderen, ihm entgegenkommenden Moleküls durchstoßen und mit der positiven Ladung des anderen in Kontakt treten kann. Dabei wird diese positive Ladung neutralisiert, und die kinetische Energie verwandelt sich in elektrostatische. Durch die elektrostatische Kraft bleiben beide Moleküle aneinander hängen, und der negative Ladungsüberschuß wirkt sich als Vergrößerung des negativen Feldes aus (Abb. 1 b). Wiederholt sich dieser Vorgang mehrmals, so müssen Ketten entstehen, die wiederum nach außen eine negative Ladung zeigen. An die Ketten werden sich Wasserdipole so anlegen, daß auch ihre negativen Pole nach außen zeigen (Abb. 1 c). Je mehr derartige Ketten sich bilden, und je länger sie werden, desto träger wird das System. Die am Ende praktisch unbewegliche Zusammenballung von Molekülen wird einem *Donnan-Gleichgewicht* zustreben. Freie Anionen werden ausgestoßen. Freie Kationen lagern sich zwischen die negativ geladenen Ketten ein und schaffen so eine feste elektrostatische Bindung zwischen den einzelnen Makromolekülketten. Gleichzeitig wird das nicht elektrostatisch gebundene Wasser ausgetrieben. Das Ergebnis dieser Vorgänge ist das Koazervat.

Aus dieser Ableitung geht hervor, daß eine wesentliche Voraussetzung für die Koazervation das Dipolmoment und der negative Ladungsüberschuß der Eiweißmoleküle sind. Für die Bedeutung dieser Faktoren sprechen unsere Versuche [3], Koazervate aus Serumproteinen herzustellen. Die Globuline eigneten sich, wie das auf Grund ihres ausgeprägten Dipolmoments zu erwarten war, sehr gut zur Herstellung von Koazervaten. Albumine, die ein schwaches Dipolmoment aufweisen, ergaben unter den von uns untersuchten Bedingungen kein Koazervat.

Das Dipolmoment und der negative Ladungsüberschuß bewirken, daß eine Bindung der einzelnen Moleküle nur unter Aufwand kinetischer Energie möglich ist. Beim Zusammenprall zweier derartiger Moleküle wird sich naturgemäß ein Teil der kinetischen Energie dem angestoßenen Molekül mitteilen und als neuer Wärmeimpuls verfügbar bleiben. Die übrige kinetische Energie aber wird, wie schon beschrieben, in elektrostatische Energie übergeführt und geht in das Molekül ein. Dadurch müßte die kinetische Energie des gesamten Systems herabgesetzt werden, wobei ein Absinken der Temperatur zu erwarten wäre. Das müßte sich vor allem in der Gleichgewichtsflüssigkeit auswirken, da aus ihr die kinetisch reichsten Teilchen in das Koazervat auswandern. Aufgabe der vorliegenden Untersuchung sollte es sein, etwaige Temperaturbewegungen dieser Art nachzuweisen.

Methode und Versuchsergebnisse

Wir benutzten für die Experimente das „klassische“ Koazervat aus zwei-prozentigem Gummiarabikum, zwei-prozentiger Gelatine und $\frac{1}{10}$ n Salzsäure im Verhältnis: 49,7 : 49,7 : 0,6%. Je 99,4 cm³ Gummiarabikum und 99,4 cm³ Gelatine wurden in zwei verspiegelte Dewar-Gefäße gebracht, von denen eins als Reaktions-, das andere als Kontroll-Gefäß diente. Beide Gefäße wurden nachts im Trockenschrank bei ca. 45° C vortemperiert. Zum

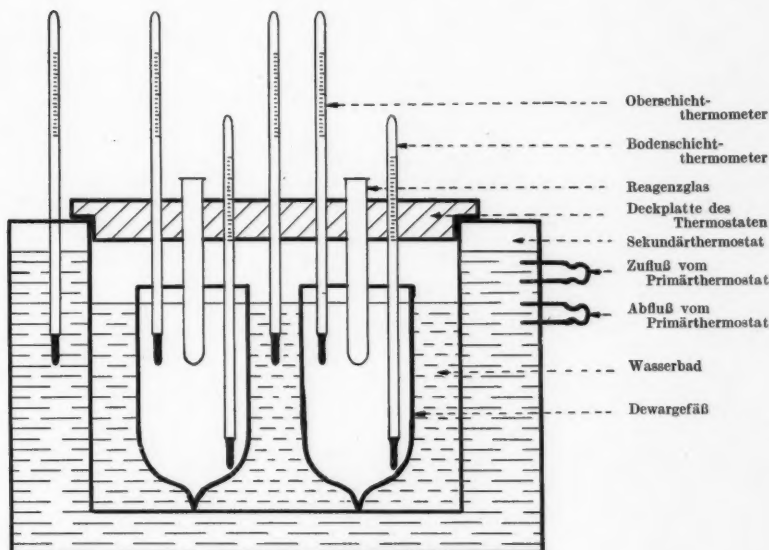


Abb. 2.

Versuch wurden sie in den Wasserbadeinsatz eines Ultrathermostaten gebracht, der zur Vermeidung von Erschütterungen auf einem Tisch mit schwingungsdämpfender Unterlage stand und von einem zweiten, auf einem anderen Tisch stehenden Thermostaten aus beheizt wurde. Die Temperatur wurden auf 43,3° C gehalten, wobei die Temperatur an der Oberfläche des Wasserbadeinsatzes 45° C betrug. In die Dewar-Gefäße tauchten gleichartige Präzisionsthermometer ein, deren eines für die Oberflächen- und eines für die Boden-Temperatur bestimmt war. Außerdem hing vom Deckel aus in jedes Dewar-Gefäß ein Reagenzglas mit dünn ausgeblasenem Boden hinein. In einem befand sich die zur Auslösung der Koazervation erforderliche Menge von 1,2 cm³ Salzsäure, im anderen die gleiche Menge Aqua dest. Sämtliche Durchlässe im Deckel waren weitgehend gegen Wärmeverluste isoliert (Abb. 2). Der ganze Ansatz wurde eine Stunde lang kontrolliert und reguliert, bis die Thermometer konstant blieben, beziehungsweise keine ungleichmäßigen Änderungen mehr anzeigten und die Gefäßthermometer

praktisch die gleiche Temperatur wie die Flüssigkeit in den Reagenzgläsern aufwiesen.

Nach diesen Vorbereitungen wurden die Reagenzgläser mit Hilfe von Glasstäben, die von Anfang an darin temperiert worden waren, gleichzeitig durchstoßen. Die in ihnen befindlichen Flüssigkeiten flossen in die Dewar-Gefäße aus. Darauf wurden beide Gefäße mit ruhigen, gleichmäßigen Bewegungen kurzzeitig vertikal durchmischt. Zu diesem Zweck waren die zum

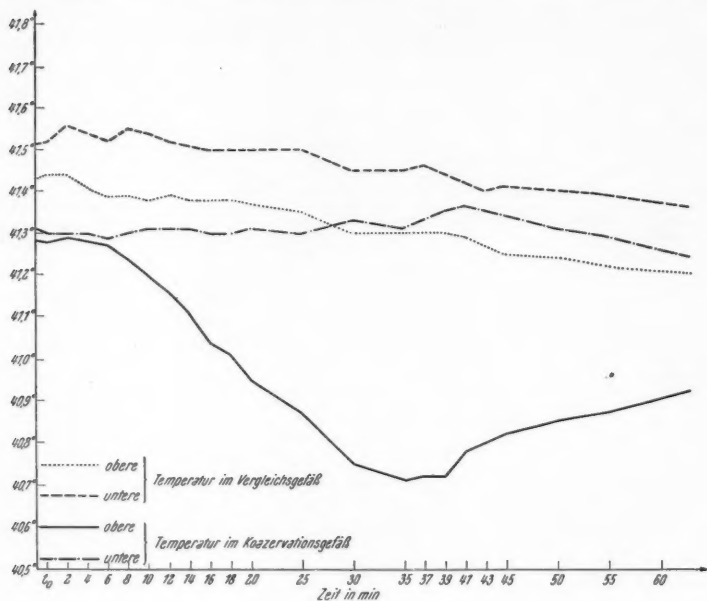


Abb. 3.

Durchstoßen verwendeten Glasstäbe am unteren Ende gestaucht und plattenförmig verbreitert worden. Dann wurden die Glasstäbe herausgenommen und die Reagenzglasöffnungen verkorkt. Gleichzeitig begannen wir an sämtlichen Thermometern mit periodischen Temperaturablesungen. Die Ergebnisse wurden in Kurven dargestellt, von denen eine in Abb. 3 wiedergegeben ist. Die anderen verliefen völlig gleichsinnig.

Dabei zeigte sich an den Thermometern des Kontrollgefäßes wie auch an dem der Badoberfläche ein gleichmäßiges leichtes Absinken. Es ist wahrscheinlich auf schwer vermeidbare Verluste durch Wärmeleitung zurückzuführen und dürfte das Versuchsgefäß in gleicher Weise betroffen haben. Davon unabhängig begann jedoch die Oberflächen temperatur des Reaktionsgefäßes fast unmittelbar nach dem Beginn der Koazervation zu fallen, und zwar fiel sie ungefähr so lange, wie gemäß nephelometrischer Untersuchung das Absetzen der Koazervatschicht dauert. Dann stieg sie

langsam wieder an und strebte dem durch die Isolationsmaßnahmen stark verzögerten Ausgleich mit der Gesamttemperatur des Systems zu. Die Bodentemperatur stieg im gleichen Zeitraum geringfügig an. Sie zeigte ein Maximum, das gegenüber dem Minimum der Oberflächentemperatur um etwa 5 min verschoben war. Dann senkte sich auch ihre Kurve in der Richtung auf einen Ausgleich. Beide Verschiebungen lagen oberhalb der experimentellen Fehlergrenze.

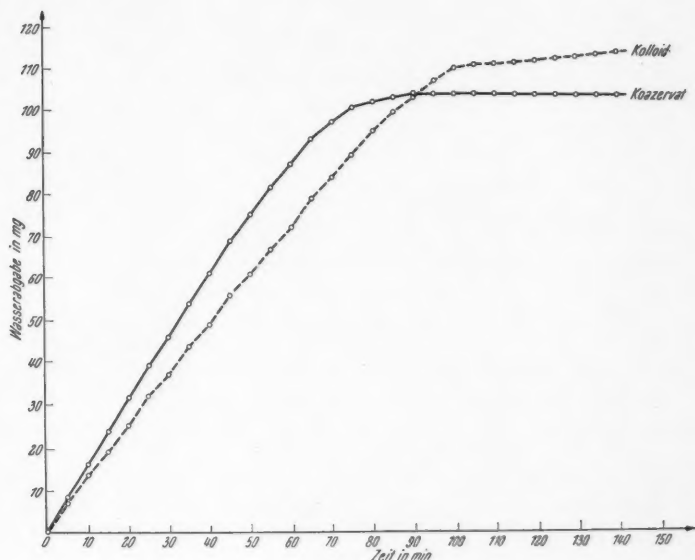


Abb. 4.

Der Versuch wurde nach zahlreichen Verbesserungen der Versuchsbedingungen mit der beschriebenen Technik sechsmal wiederholt und erwies sich als reproduzierbar. Zur Kritik sei hinzugefügt, daß das Phänomen nicht durch die Oberflächentemperatur des Wasserbades verursacht worden sein kann, denn

1. hätte dieser Einfluß das Vergleichsgefäß ebenfalls betreffen müssen,
2. verlief der Versuch bei Abdeckung der Dewargefäß-Flüssigkeiten mit Paraffinöl genau im gleichen Sinne.

Es kann sich auch nicht um Neutralisationswärme gehandelt haben, denn

1. ergab ein Gegenversuch bei der verwendeten Säurekonzentration überhaupt keine nachweisbare Wärmebewegung,
2. ergab ein Gegenversuch mit stärkerer Konzentration, daß die auftretende Wärmebewegung zu einem Absinken der unteren Temperatur führte.

Diskussion

Das experimentelle Ergebnis entsprach der im Zusammenhang mit unserer Darstellung der Koazervatbildung ausgesprochenen Vermutung. Wir nahmen an, daß bei der Koazervation kinetische Energie in elektrostatische übergehe und daß sich dadurch die Gleichgewichtsflüssigkeit, der diese Energie entzogen wird, abkühlen müsse. Da auf Grund des spezifischen Gewichts die Koazervatröpfchen aus der Gleichgewichtsflüssigkeit heraus zu Boden sinken, muß sich, wie es die Kurve erkennen läßt, die Abkühlung vorwiegend in der Oberschicht bemerkbar machen. Ihr Minimum müßte erreicht sein, wenn die Koazervation abgeschlossen ist. Beim Zusammenprall der Moleküle muß jedoch ein Teil der Energie in Gestalt von Wärme auf die Koazervateilchen übergehen. Infolgedessen nimmt während des Absinkens der erwärmten Teilchen die Temperatur in der Oberschicht noch weiter ab. In dieser Zeit werden die Koazervatröpfchen infolge ihrer extrem kleinen Oberfläche bereits wieder etwas Wärme an die Oberschicht abgeben. Andernfalls wäre der beobachtete Effekt noch größer. In dem Maße, in dem sich die Koazervateilchen am Boden sammeln, steigt die vom Bodenthermometer angezeigte Temperatur. Entsprechend der langsamen Absinkgeschwindigkeit dieser Teilchen, setzt sich die geringe Temperaturzunahme der Unterschicht noch etwas fort, nachdem die Oberschicht bereits ihr Minimum erreicht hat. Deshalb ist das Maximum der Bodentemperaturkurve etwas gegen das Minimum der Oberflächentemperaturkurve verschoben. Allerdings läßt sich mit dieser Versuchsanordnung die Wärmeabgabe der Koazervatröpfchen nicht quantitativ erfassen. Das Überwiegen der Abkühlung in der Oberschicht bedeutet jedoch, daß auf jeden Fall die Temperatur des gesamten Systems eindeutig gesunken ist, wobei der Gleichgewichtsflüssigkeit Energie entzogen wurde. Damit kann es als bewiesen angesehen werden, daß die Koazervation mit der Speicherung von Energie verbunden ist.

Gleichzeitig ist festzustellen, daß hier offenbar eine Energieaufnahme aus einem homogenen Milieu stattfindet. Das scheint im Widerspruch zum zweiten Hauptsatz der Thermodynamik zu stehen, der aussagt: „Wärme kann nur dann in Arbeit verwandelt werden, wenn ein Teil der Wärme von einem Körper höherer Temperatur auf einen Körper niedriger Temperatur übergeht.“ In unserem Falle wäre jedoch im Sinne der Carnotschen Gleichung $T_1 = T_2$. Das heißt, es wäre unter normalen Verhältnissen keine Arbeit möglich. Es ist auch kaum anzunehmen, daß die Gültigkeit des zweiten Hauptsatzes begrenzt sei und die Koazervation eine Ausnahme darstelle. Der Anwendungsbereich dieses Satzes ist jedoch dadurch eingeschränkt, daß nur dann keine Arbeit möglich ist, wenn nicht gleichzeitig eine Zustandsänderung stattfindet. Tatsächlich erinnert die Koazervation an andere Prozesse, die mit einer Änderung des Aggregatzustandes verbunden sind. So finden wir die Abkühlung des Milieus bei der Lösung von Mineralien in Wasser und beim Verdampfen von Wassermolekülen an der Oberfläche von Wasserschichten wieder. Auch das Verdampfen ist ein Prozeß, bei dem jeweils die energiereichsten Wasserteilchen aus dem Milieu

herausgeschleudert und so der zurückbleibenden Flüssigkeit entzogen werden. Diese Prozesse beweisen, daß eine einmalige und mit einer Änderung des Aggregatzustandes verbundene Arbeitsleistung mit dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik durchaus vereinbar ist.

Eine weitere Ähnlichkeit zwischen Prozessen, die als Zustandsänderungen bekannt sind, und der Koazervation besteht im gelegentlichen Auftreten von kritischen Temperaturen bei der Koazervation. Wir kennen derartige kritische Temperaturen bei Zustandsänderungen als Siedepunkt und als Schmelzpunkt. Eine ähnliche kritische Temperatur konnten wir bei einer früheren Arbeit [3] beobachten, die sich mit der Biosphärolithbildung, einem Sonderfall der Koazervation, befaßte. In diesem Falle handelte es sich um Biosphärolithe aus Elektrolyten verschiedener Art und nativem Protein aus Hühnereiern. Dieser Prozeß erwies sich deutlich als temperaturabhängig. Während er aber bei Temperaturen zwischen 40° und 340° C ein Q_{10} von etwa 2 aufwies, stieg der Temperaturkoeffizient zwischen 340° und 440° C auf etwa 10 an. Im Sinne der beschriebenen Überlegung wäre das so zu deuten, daß bei dieser Temperatur der überwiegende Teil der Eiweißmoleküle die zur Koazervation erforderliche kinetische Energie erreichte. Daß diese kritische Koazervationstemperatur außerdem gerade in dem Bereich auftrat, in dem die normale Körpertemperatur der Hühner liegt, soll hier nicht näher erörtert werden. Es ist aber ein bemerkenswerter Hinweis auf die große biologische Bedeutung der Koazervationsprozesse.

Wir können also behaupten, daß die Koazervation nicht nur einen Phasenwechsel darstellt, sondern daß sie sich in energetischer Beziehung so verhält, als ob sie mit dem Übergang in einen neuen Aggregatzustand verbunden wäre. Sollte sich diese Auffassung als zutreffend erweisen, so ergäbe sich damit gleichzeitig eine völlig neue Situation für die Beurteilung der Vorgänge im lebenden Protoplasma. In diesem Sinne hat beispielsweise Segal [6] den Koazervatzustand in eine Theorie des Erregungsprozesses eingebaut. Er nimmt an, daß bei der Erregung eine kurzzeitige pH-Senkung erfolgt. Diese leitet eine partielle Denaturierung der Plasma-Eiweiße ein, die zu einem Verlust des negativen Ladungsüberschusses und damit zu einem Zusammenbrechen des Koazervatzustandes führt. Die dabei freiwerdende Energie wird für die bei der Erregung auftretenden Ionenverschiebungen verantwortlich gemacht. Das Beispiel zeigt gleichzeitig, daß sich auch vom energetischen Standpunkt aus die Benutzung des Koazervatbegriffes für die Deutung elementarer Lebensvorgänge als fruchtbar erweist.

Literatur

- Booij, H. L., and H. G. Bungenberg de Jong, 1956: Biocolloids and their Interactions. *Protoplasmatologia* 1/2.
- [1] Bungenberg de Jong, H. G., 1950: Koazervation. *Kolloid-Z.* 50.
- 1952: Die Koazervation und ihre Bedeutung für die Biologie. Sammelreferat. *Protoplasma*, XV.
- 1953: Über Koazervation, I und II: Komplexkoazervat des Systems Gummiarabikum — Gelatine. *Kolloid-Beih.* 43.

- [2] Lepeschkin, W. W., 1957: Zellnekrobiose und Protoplasmatod. Protoplasma-Monographien 12/41.
- [3] Linke, W., 1955: Beobachtungen an Biosphärolithen. Wissenschaftl. Zeitschrift d. Humboldt-Universität, Math.-Nat. Reihe, IV/1.
- [4] Oparin, A. J. 1957: Die Entstehung des Lebens auf der Erde. Deutscher Verlag der Wissenschaften; ins Deutsche übersetzt nach der 3. Auflage, Berlin.
- [5] Ostwald, W., 1929: Kolloidchemische Reaktionen zwischen Solen von Eiweißkörperchen und polymeren Kohlehydraten. Kolloid-Z. 47.
- [6] Segal, J., 1957: Die Erregbarkeit der lebenden Materie. Jena.
— 1957: Membrantheorie und Alterationstheorie der Erregung. Physiologia Bohemoslovenica, VI. Fasc., 3.
- [7] Troschin, A. S., 1958: Das Problem der Zellpermeabilität (deutsche Ausgabe). Jena.

Über bemerkenswerte Entwicklungsformen bei *Candida albicans* und ihre Färbbarkeit mit Nilblau

Von

Hertha Weixl-Hofmann, Wien

Mit 28 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. September 1959)

In meiner Arbeit „Über die Sporenbildung bei bisher als asporogen geltenden Hefearten“ (1959) habe ich bereits berichtet, daß bei meinen Versuchen neben den sporenführenden Zellen stets auch solche auftraten, die mit Granula angefüllt waren. Dabei zeigte sich, daß diese Granula keineswegs als bloße Inhaltskörper anzusehen sind, sondern selbständige, entwicklungsfähige Gebilde darstellen.

Gerade dieser Umstand war es, der mich veranlaßte, eingehende Untersuchungen mit einer anderen Hefeart, der *Candida albicans*, durchzuführen, ist doch dieser Pilz stets im menschlichen Organismus anzutreffen und kann dort zu pathogenen Auswirkungen kommen.

Die *Candida albicans* gehört zur Gruppe der Fungi imperfecti, also zu jenen Pilzen, bei denen nur die vegetative Vermehrungsform bekannt ist. Zwar berichtet Vuillemin (1898), daß er in Klatschpräparaten vom Soorpilz *Candida alb.* Ascusbildung beobachten konnte. Dabei liegen in jedem Ascus vier von Epiplasma umgebene Sporen. Diese Beobachtungen wurden 1929 von Okabe bestätigt. Langeron und Guerra (1938), denen die Aufschlüsselung der Gattung *Candida* in Arten zu danken ist, lehnten die Mitteilungen über die Sporenbildung bei *Candida alb.* als zu ungenau ab. Als charakteristisches Merkmal für diese Art führten sie die Fähigkeit an, Chlamydosporen auszubilden.

S. Windisch konnte 1940 bei *Cand. pulcherrima* und *Cand. tropicalis* feststellen, daß aus den Chlamydosporen derselben Asci hervorgehen, in denen vier Sporen zur Entwicklung kamen.

Über *Cand. alb.* selbst liegen keine weiteren Mitteilungen vor.

Die Vermehrung der *Cand. alb.* vollzieht sich in der Weise, daß sie zunächst ein Pseudomycel entwickelt und auf diesem dann hefeartige Sprosse, die Blastosporen, ausgebildet werden. Diese Zellen sind oval bis rund und besitzen eine stark ausgebildete Membran. Im Innern der Zellen,

und zwar auch schon bei jugendlichen, findet sich immer ein stark glänzender runder Körper vor, der mit Sudan 3 Gelbfärbung zeigt, mithin also Fettcharakter hat. Das Vakuolensystem tritt bei *Cand. alb.* nicht so stark in Erscheinung wie bei anderen Hefen und auch die Ausbildung der Granula, wie diese beim Altern und auch durch bestimmte Kulturbedingungen ansonsten eintritt, ist hier in diesem Ausmaße nicht zu beobachten. Die Oberflächenkulturen sind wachsartig, cremefarbig und glatt. In flüssigen Nährmedien bilden ältere Kulturen ein reiches, mehr schleimiges Mycel aus, das gelb gefärbt ist. Die Riesenkolonien sind haarig. Die Stoffwechselvorgänge bei *Cand. alb.* sind bekannt. Diese Hefe vermag zwar sehr viele Zuckerarten zu assimilieren, jedoch nur wenige zu vergären, wobei ihr Gärvermögen oft äußerst gering ist.

Bei den *Torulopsis*-Arten gelang es mir, durch vorsichtigen Wasserentzug aus dem Protoplasma in demselben biologische Veränderungen herbeizuführen, die nach Auftragen der Zellen auf einen sterilen Gipsblock zur Ausbildung von Sporen führten. Der Wasserentzug, der vor allem die Grenzschichten betraf, wurde durch Kälte- und Hitzeeinwirkung, Trocknungsprozesse oder durch Einwirkung osmotisch wirksamer Substanzen und durch pH-Verschiebung bewirkt.

Bei meinen Versuchen mit *Cand. alb.* schlug ich denselben Weg ein wie bei *Torulopsis*. Zur Untersuchung kamen vier Stämme. Zwei derselben erhielt ich aus dem Hygienischen Institut der Wr. Universität und einen weiteren aus dem Milchwissenschaftlichen Institut der Hochschule für Bodenkultur, wofür ich beiden Instituten meinen besten Dank ausspreche. Den vierten Stamm isolierte ich selbst aus einem Duodenalsaft.

Diese vier Hefestämme zeigten ein durchaus übereinstimmendes Verhalten.

Die Kulturen wurden auf Würze und Würzeagar geimpft. Nach etwa drei Stunden begann die Hefe bereits zu sprossen. Auffallend war dabei, daß in den Vakuolen der meisten Zellen ein oder auch mehrere Körperchen zu sehen waren, die sich in lebhafter Brownscher Molekularbewegung befanden.

Tanzende Körperchen sind ja in Hefezellen oftmals anzutreffen, aber in jeder Vakuole meist nur eines. Die Regelmäßigkeit und Häufigkeit sowie der Zeitpunkt ihres Auftretens scheint für *Cand. alb.* besondere Geltung zu haben. Im Verlauf der Untersuchungen konnte dieser Vorgang genauer verfolgt werden, worauf ich noch zurückkomme.

Nach Ablauf weiterer 24 Stunden, die Hefe war inzwischen kräftig angewachsen, erfolgte die zweite Überimpfung. Entsprechend meinen Versuchen mit *Torulopsis*, wurden sowohl die neue Würze als auch der Würzeagar vorher auf pH-Werte von 4,0, 5,6 und 8,0 eingestellt.

Auf den Nährböden mit dem pH-Wert 4,0 war die Sproßtätigkeit im Vergleich zu denen mit höheren pH-Werten wesentlich herabgemindert. Es kam zur Ausbildung kleiner Sproßverbände aus drei bis vier runden, kleinen Zellen.

In Würze und auf Agar mit pH 5,6 entwickelte sich die Hefe ausgezeichnet. Auf Würzeagar mit pH 8,0 war ebenfalls starke Vermehrung

eingetreten. Die Zellen waren zum Teil sehr groß und besaßen eine starke Zellwand. In der alkalischen Würze hingegen kam es nach einigen Tagen zur Ausbildung runder Zellen, die eine Schichtung des Zytoplasmas erkennen ließen.

Jene grundlegenden Veränderungen im Plasma, wie sie bei meinen seinerzeitigen Versuchen mit *Torulopsis* nach solchen Präparationen eingetreten waren, konnte ich hier nicht beobachten. Auch durch Zugabe von osmotisch wirksamen Substanzen, wie CaCl_2 , KNO_3 oder auch von Glycerin zur Würze konnte der Zustand der Plasmaentmischung nicht erreicht werden.

Ich versuchte nun noch den Wasserentzug durch Temperatureinwirkungen herbeizuführen. Die Zellen wurden bei diesen Versuchen Temperaturen von -18° , -3° , $+45^\circ$ und $+95^\circ \text{C}$ durch verschieden lange Zeit hindurch ausgesetzt. Hierauf wurde Würze zugesetzt und die Kulturen bebrütet. Nach 24 Stunden waren alle Kulturen bis auf jene, die längere Zeit hindurch 95° ausgesetzt worden war, gut angegangen. In den gekühlten Proben waren keine Fetttropfen zu bemerken. Obwohl auch bei diesen Versuchen keine Veränderungen im Plasma auftraten, trug ich die Proben dennoch auf sterile Gipsblöcke auf, um das weitere Verhalten der Zellen zu verfolgen.

Nach 24 Stunden waren in der tiefgeköhlten Kultur viele Zellen entleert, wobei viele kleine Kügelchen entweder auf der Außenseite der Membran aufsaßen oder frei im Medium lagen.

Die Zellen der anderen Kulturen wiesen keine wesentlichen Veränderungen auf. Auch in den folgenden Tagen konnten bei diesen Proben keine Anzeichen für eine Sporenbildung festgestellt werden.

Hingegen konnte bei Verfolgung der geschilderten Vorgänge ein anderer Evolutionsprozeß beobachtet werden.

Bei Betrachtung alternder Kulturen von *Cand. alb.* fällt auf, daß in den Zellen keine oder nur schwach entwickelte Vakuolen und auch nur vereinzelte Granula vorhanden sind, während die Kugel bedeutend an Größe zugenommen hat. Nach einiger Zeit treten in letzterer Veränderungen ein.

Die bisher in ihrem Aufbau homogen erscheinende Kugel läßt eine Differenzierung ihrer Substanz in mehrere konzentrische Schichten erkennen. An eine stark ausgeprägte äußere Schichte schließt sich eine etwas hellere Binnenschicht an, die wieder konzentrische Differenzierungen aufweisen kann. Im Zentrum liegt ein stark glänzendes, kleines Körperchen.

In einem späteren Stadium verdichtet sich die Randzone, wobei das Innere der Kugel an Substanz zu verlieren scheint. Die sonderbare Schichtenbildung der Kugel läßt vermuten, daß hier in der Kugelsubstanz Veränderungen eingetreten sind. Auch im Zytoplasma ist ab und zu Schichtenbildung zu erkennen.

Bei meinen Versuchen am Gipsblock konnte ich beobachten, daß schon nach wenigen Tagen die Größenzunahme der Kugel und hierauf ihre Differenzierung in Schichten eintritt. Besonders in Zellen, die vorher der Kälte ausgesetzt worden waren, traten diese Erscheinungen sehr bald ein.

Diese Zellen schienen daher besonders geeignet, den Ursachen der sonderbaren Veränderungen in den Kugeln und dem weiteren Verlauf der Entwicklung nachzugehen.

Ich übertrug also Zellen aus einer Würzekultur, die vorher einer Kältebehandlung ausgesetzt worden waren, auf einen sterilen Gipsblock. Bereits nach vier bis fünf Tagen waren die Vakuolen stark zurückgetreten und oftmals nicht mehr vorhanden, auch Granula waren nicht mehr zu sehen. Im Zellinnern fand sich hellgrünes undifferenziertes Plasma vor, in dem, von einer hellen Zone umschlossen, die große Kugel lag (Abb. 1).

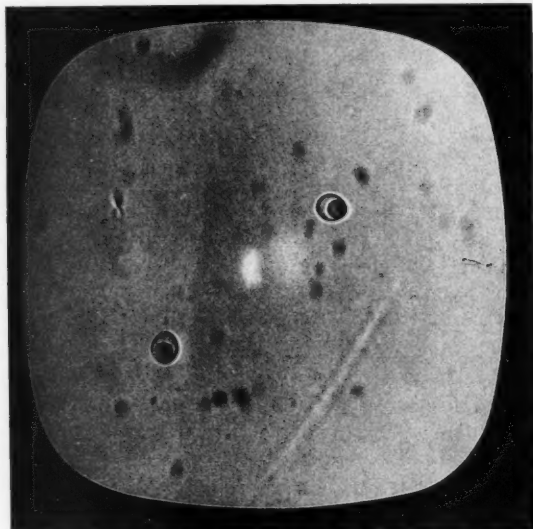


Abb. 1. Im undifferenzierten Plasma der Zelle liegt die große Kugel, umgeben von einer hellen Zone.

Ich versuchte mit Färbemethoden Einblick in die Natur der Kugel zu gewinnen.

Mit Sudan 3 behandelt, trat entweder keine Farbreaktion ein, oder aber die Kugel zerfloß und die ganze Zelle färbte sich zart hellgelb. Die Anfärbung der Kugel selbst gelang also hier nicht.

Mit Methylenblau färbte sich die Membran prachtvoll türkis an und das Zellinnere wurde dunkel blauviolett.

Sehr aufschlußreich verlief die Sporenfärbung nach Czapelewski. Die Färbedauer lag zwischen 5 und 10 Minuten. Viele Zellen erlitten bei der Fixierung anscheinend ein Aufreißen der Zellwände. In diesen Fällen trat aus der hellblau gefärbten halbkugeligen Membranschale die rot gefärbte Kugel aus. Auch außerhalb der aufgerissenen Zellen lagen viele rote Kugeln und Kügelchen, die offenbar aus aufgerissenen Zellen stammten.

Es fanden sich aber immer noch eine Anzahl intakter Zellen im Präparat vor, in denen die rote Kugel von einer hellblau gefärbten starken Membran umschlossen war. Dabei zeigte sich bei einigen Individuen, daß die Kugel nicht einheitlich rot gefärbt war, daß vielmehr in einer hellblauen Grundsubstanz zahlreiche rot gefärbte Kügelchen und Fädchen vorhanden waren, die in ihrer Gesamtheit den Eindruck der durchgehenden Rotfärbung hervorriefen.

In jenen Zellen aber, in denen sich keine Kugel vorfand, färbten sich einzelne kleinere Inhaltskörper leuchtendrot an.

Die Unterschiede in der Anfärbung der Kugel lassen erkennen, daß in den Zellen verschiedene Stadien der Ausdifferenzierung der Kugelsubstanz vorlagen. Die ursprünglich homogen erscheinende Kugel muß also Veränderungen erfahren haben.

Im folgenden sollen die Kugeln, die keinen homogenen Charakter mehr haben und Schichtung aufweisen, als „Schichtkugeln“ bezeichnet werden.

Die Größenzunahme der Kugel und die Entwicklung derselben zur Schichtkugel geht in den Zellen vor sich, die durch längere Zeit keinerlei Nahrung erhalten haben. Der bebrüteten Gipsblockkultur steht ja nur Feuchtigkeit und Luft zur Verfügung.

Verfolgt man die verschiedenen Wachstumsphasen der Kugel, so sieht man, daß mit der Größenzunahme der Kugel eine Entleerung des Plasmas einhergeht. Dabei scheint das Plasma an Substanz zu verlieren. Man gewinnt bei der Verfolgung dieser Vorgänge den Eindruck, daß Substanzteile irgendwie Eingang in die Kugel finden und durch die Fettsubstanz derselben zunächst geschützt werden. Bleiben aber die abnormalen Lebensverhältnisse weiterhin bestehen, so kommt es nach einiger Zeit zu Reaktionen im Komplex Kugel, die äußerlich in der schichtenförmigen Strukturbildung zum Ausdruck kommen.

Folgende typische Entwicklungsstadien der Kugel in den Zellen konnten in zahlreichen Versuchen immer wieder festgestellt werden.

1. In der Zelle liegt in einer strukturlosen, plasmatischen Substanz die große Kugel. Sie liegt nicht zentral und ist von einer hellen Zone umgeben.
2. Die Kugel füllt die Zelle, die runde Form angenommen hat, bis auf eine schmale Randzone aus.
3. Die Kugel füllt die Zelle zur Gänze aus und diese ist von einer starken Membran umgeben.
4. Die Kugel liegt frei in einer optisch leeren Zelle. Diese hat meist zugespitzte Form und zeigt deutlich eine Öffnungsstelle.
5. Die Schichtkugel liegt in einer Zelle, die noch Plasma und Vakuole enthält.
6. In der Zelle finden sich mehrere Schichtkugeln vor.
7. Die Zelle ist mit mehreren ziemlich gleich großen Kugeln ausgefüllt, die oft traubenartig zusammenhängen.

Dies sind die Bilder, die immer wieder zu sehen waren.

Beläßt man die Zellen weiter auf dem Gipsblock, so treten allmählich

Auflösungserscheinungen ein, die von der Kugel ihren Ausgang nehmen und reichliche Granulabildung in derselben auslösen.

Die geschilderten Veränderungen können auch in Zellen jeder alternden Kultur beobachtet werden.

Um die Entwicklung aller dieser auftretenden Formen und Elemente verfolgen zu können, wurden Zellen vom Gipsblock auf ein Nährmedium übertragen. In Würze trat nur langsam Entwicklung der bisher stark belüfteten Zellen ein und erst nach zwei Tagen konnte das Wachstum als normal befunden werden. Auf Würzeagar hingegen, begannen die Zellen bereits nach drei bis vier Stunden Sprosse auszubilden. Es konnte aber auch beobachtet werden, daß aus manchen Zellen lipoide Granula austraten, die sich vermehrten. In Bouillon lösten sich viele Zellen alsbald auf und dabei erfolgte das Austreten zahlreicher Granula.

Um auch diese Vorgänge verfolgen zu können, wurden neben den laufenden Beobachtungen jetzt auch solche an Dauerpräparaten durchgeführt, die sich oft bis auf zehn Tage erstreckten.

Die ersten Versuche wurden nach dem Lindnerschen Tröpfchenverfahren durchgeführt. Bald ging ich aber zu folgender Methode über. Am Rande eines sterilen Objektträgers wurde ein Tropfen heißer Würzeagar aufgetragen, rasch mit der Kante eines zweiten Objektträgers ausgestrichen und hierauf der erstere sofort in eine sterile Petrischale gelegt. Nach Erstarren der dünnen Agarschicht wurde dann in einem Flüssigkeitstropfen das zur Beobachtung gelangende Material aufgesetzt, das Präparat abgedeckt und mit Vaseline verschlossen. Die Präparate kamen zwischen den Beobachtungszeiten in eine feuchte Kammer und wurden bebrütet.

Mit dieser Methode erreichte ich einerseits die Fixierung des Objektes, während andererseits die nun eintretenden Entwicklungsvorgänge in mehreren Zellen gleichzeitig verfolgt und verglichen werden konnten.

Durch die geringe Nahrungsgabe war die Vermehrung der Zellen so begrenzt, daß kein Wuchern derselben eintreten konnte. Daher war es möglich, auch nach Tagen noch Vorgänge in der Zelle zu erkennen. Sehr bald stellt sich nämlich neuerdings Nahrungsmangel ein, der durch die eintretenden anaeroben Verhältnisse in der Kammer und die Anhäufung der Stoffwechselprodukte verstärkt, eine neue schwere Attacke auf das Leben der Zelle darstellt. Die Reaktion der Zelle auf diese neuerlichen ungünstigen Lebensbedingungen war, wie sich zeigte, zur Klärung mancher Frage von ausschlaggebender Bedeutung.

Bei den zahlreichen so angestellten Versuchen konnte übereinstimmend folgendes beobachtet werden:

Aus vielen der Zellen, die von der Kugel zur Gänze ausgefüllt waren, tritt nach ungefähr einer Stunde die große Kugel aus einer Öffnungsstelle der Zellwand ins Außenmedium aus. Die Membran bleibt schleifenartig zurück. Nach einer weiteren Stunde zeichnet sich eine helle Stelle auf der Kugel ab, die sich alsbald als Vegetationsscheitel erweist. Im Verlauf der nächsten halben Stunde sproßt hier ein kleines Kügelchen hervor. Dasselbe wird größer und sproßt selber wieder neue Kügelchen ab. Die neuen

Sprosse wachsen heran, erreichen jedoch nicht mehr die Größe der Mutterkugel. Diese verkleinert sich bei dem Sproßvorgang mehr und mehr. Sehr oft bildet sich die ausgetretene Kugel zunächst zur Schichtkugel um und dann erst beginnt die Absprossung einzusetzen (Abb. 2 und Abb. 3, 4, 5, 6, 9).

In den Zellen, bei denen kein Austritt der Kugel erfolgte, bildete sich auf dieser, und zwar ebenfalls nach zwei Stunden, eine Sproßstelle aus. In der Mehrzahl der Fälle entwickelte sich ein Sproß, der die Zellwand

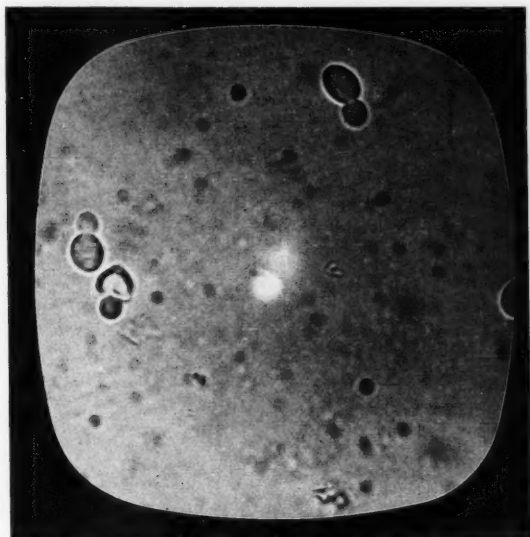


Abb. 2. Die Kugel tritt aus der Zelle aus.

durchbrach und im Außenmedium selbst wieder zu sproßen begann. Nur in vereinzelten Fällen kam es auch nach Tagen zu keiner Sproßbildung. Diese Zellen hatten eine starke Membran und erschienen dunkler in der Farbe. Offenbar handelt es sich um Chlamydosporen.

In der Kulturflüssigkeit finden sich nach einiger Zeit viele kleine Hefezellen vor. Vorläufig kann noch nicht gesagt werden, ob diese aus Kugelsprossen hervorgegangen sind oder ob die Ausgangszelle nach Absprossung der Kugeln noch kleine Hefezellen ausgebildet hat.

Zellen, die von der Kugel nicht zur Gänze ausgefüllt waren, veränderten ihre Form und nahmen ovale Gestalt an. Bei diesen Zellen konnten, ihren Reifegrad kennzeichnend, zwei Wege der Entwicklung beobachtet werden.

In dem einen Falle sind in den Zellen nach dem Übertragen auf ein Nährmedium außer der großen Kugel zwar noch eine Feingranulierung des Plasmas und schwache Vakuolenbildung zu sehen, doch tritt keine Ausbildung zur normalen Zelle mehr ein. Anscheinend sind

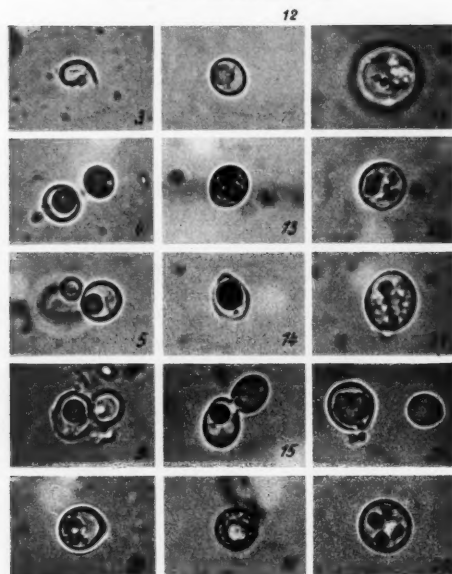


Abb. 3. Die Zellwand bleibt nach erfolgtem Austritt der Kugel schleifenartig zurück.

Abb. 4. Die Kugel bildet eine Sproßstelle aus und beginnt zu sprossen.

Abb. 5. Austritt eines Kugelsprosses aus der Zelle.

Abb. 6. Die Kugelsprosse bringen neue Sprosse hervor (Nilblaufärbung).

Abb. 7. Sprossung der Kugel innerhalb der Zelle.

Abb. 8. Die Kugelsprosse liegen wie Glieder einer Kette in der Zelle.

Abb. 9. In der Zelle befindet sich eine Schichtkugel.

Abb. 10. Aufbrechen der Schichtkugel und Ablösung lichtbrechender Granula.

Abb. 11. Czaplewski-Färbung. In den Zellen färben sich die Kugeln rot an. Sind keine Kugeln vorhanden, so tritt Anfärbung kleiner Inhaltskörper ein, von denen sich einige in Teilung befinden.

Abb. 12. Aus der Kugel treten Substanzteilchen aus, wobei die Kugel kleiner wird.

Abb. 13. Nilblaufärbung. In der Zelle ist eine gelbe und eine blau gefärbte Kugel vorhanden, neben der blauen Kugel beginnt ein scheibenförmiges blaues Gebilde hervorzutreten.

Abb. 14. Aus der Kugel tritt ein Granulum hervor.

Abb. 15. In dem neuen Sproß wird ein Granulum eingebracht.

Abb. 16. Blaufärbung der Granula, die Kugel bleibt ungefärbt.

Abb. 17—21. Teilungsvorgänge innerhalb der Kugel, z. T. mit Nilblau gefärbt.

Abb. 22. Granulabildung in der Kugel.

Abb. 23. Bildung und Austritt der Granula aus Sproßkugeln.

Abb. 24. Austritt der Granula aus der Kugel.

Abb. 25. Ausbildung von vier kleineren Kugeln innerhalb der großen Kugel.

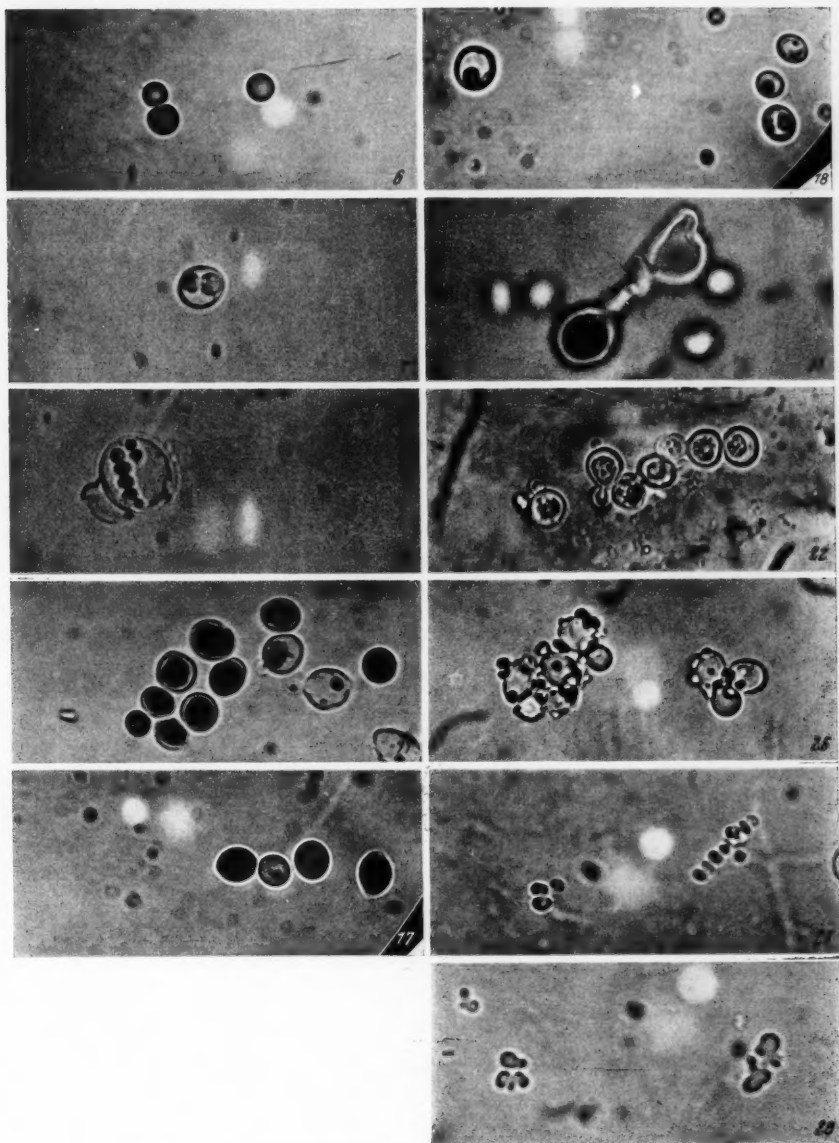


Abb. 26. Die Granula sitzen auf der Außenseite der Zellmembran auf.

Abb. 27. Kokkenform der Granula und Sprossung derselben.

Abb. 28. Große Kokkenformen — „Sprossungen“.

in diesen Zellen keine oder nur ungenügend ausgebildete Elemente des fermentativen Systems vorhanden. Es wird für die Beschädigung der Organellenstruktur eine gewisse Grenze bestehen, bei deren Überschreitung die Koordination der Reaktionen verlorengeht und es zu keinem Aufbau mehr kommen kann.

Nach zwei Stunden setzt der Sproßvorgang der Kugel ein. Aus der Kugel sproßt eine neue Kugel hervor und aus dieser wieder eine. Die Kugeln können dabei wie Glieder einer Kette aneinandergereiht sein, oder sie bauen sich pyramidenartig auf. Manchmal hängen sie traubenartig zusammen und sind nur durch eine schmale Zone von der Zellwand getrennt (Abb. 7, 8).

In dem anderen Falle handelt es sich um ein früheres Entwicklungsstadium. In der Zelle sind dann außer der großen Kugel noch Plasmareste vorhanden.

Nach ungefähr einer Stunde tritt plötzlich in der die Kugel umgebenden hellen Zone ein Granulum hervor, das sich offensichtlich von der Kugel abgelöst hat. Dieses Granulum wird stäbchenförmig und schiebt sich an das sichtbar gewordene Plasma heran. Nach erfolgtem Kontakt des Granulums mit dem Plasma wird es von demselben aufgenommen und beginnt sich zu vergrößern. Es nimmt zunächst sichel-, dann scheibenförmige Gestalt an, wobei sich die Granulasubstanz allmählich über das ganze Plasma verbreitet. Nach diesem Infiltrationsprozeß treten zunächst einzelne, dann immer zahlreichere dichte Körnchen auf, die sich über das ganze Plasma verteilen. Bald treten auch Vakuolen hervor und die Lebenstätigkeit der Zelle ist wieder voll im Gange (Abb. 14, 16).

Wie ich aus zahlreichen Versuchen erkannt habe, ist im Augenblick, da in der Zelle das Granulum sichtbar wird, die Gewähr dafür gegeben, daß die Zelle imstande ist, sich zu restituieren und als Individuum weiter bestehen zu bleiben.

Die Kugel, die nach Ausbildung des ersten Granulums noch unverändert geblieben war, beginnt, sobald die kleinen Granula im Plasma sichtbar werden, zu sprossen. Die Sproßtätigkeit der Kugel ist wieder etwa zwei Stunden nach dem Übertragen auf den Nähragar eingetreten.

Die Sprossung kann an einer oder auch an zwei Stellen gleichzeitig einsetzen. Bei diesem Prozeß verliert die Kugel immer mehr an Größe. Die neu entstandenen Kugeln sprossen nun ihrerseits wieder kleine Kügelchen ab, die sich schließlich unter den anderen Einschlufkörpern des Plasmas verlieren.

Nach einer weiteren Stunde beginnt die Zelle selbst ihren ersten Sproß auszubilden. In diesem zunächst hyalinen Sproß wird von einem Fortsatz der hellen Zone aus ein Granulum eingebracht und erst nach dem Eintritt desselben scheint die selbständige Lebensfunktion der jungen Zelle voll einzusetzen und alsbald sind feine Plasmaeinschlüsse und Vakuolen zu sehen (Abb. 15).

Ist in der Zelle außer der großen Kugel noch Plasma vorhanden, so bilden sich an Stelle des Granulums an der Grenze zwischen heller Zone

und Plasma zarte Kügelchen aus, die wie hingesprüht aussehen. Diese winzigen Granula nehmen an Zahl zu und verteilen sich über das immer deutlicher sichtbar werdende Plasma. Die Kugel bildet keine Sprosse aus, doch treten aus ihr kleine Partikelchen aus, wobei sie sichtbar flacher wird. Als bald hat die Zelle wieder normales Aussehen (Abb. 12).

Oftmals zeigte sich auch nach der Übertragung der Zellen auf ein Nährmedium im Winkel zwischen Zellwand und der ihr exzentrisch anliegenden Kugel ein kleines Plasmaklumpchen. In diesem befindet sich zunächst nur ein glashelles Kügelchen, während später noch weitere hervortreten. Aus dem Plasma ziehen sich nun allmählich feine Fäden zur gegenüberliegenden Zellwand und in den Fäden zeigen sich wieder kleine Kügelchen.

Während dieses Vorganges wird die Kugel ständig kleiner, ohne daß es zu einer Aussprossung käme. Doch ist zu sehen, daß aus der Kugel Substanzen austreten, die vermutlich die Bildung der glänzenden Kügelchen verursachen. Das Austreten der Substanz ist oft von einem ruckartigen Kleinerwerden der Kugel begleitet, wobei sie das Aussehen einer Schichtkugel annehmen kann. Der Austritt der Substanz aus der Kugel nimmt also offensichtlich seinen Ausgang vom Zentrum derselben.

Hier konnte ich auch das Entstehen der tanzenden Körperchen beobachten. Aus dem Plasmahäufchen löst sich plötzlich ein Teilchen ab und gerät sofort in Bewegung. Wie spätere Vitalfärbungen zeigten, ist die stoffliche Natur der tanzenden Körperchen eine unterschiedliche.

Wie bereits erwähnt, kann die Umstellung der Kugel zur Schichtkugel sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle vor sich gehen, und die Schichtkugel ist ebenfalls imstande, Sprosse auszubilden. Die Schichtkugeln sind stets kleiner als die Kugeln, aus denen sie hervorgegangen sind, was offenbar in der Verdichtung ihrer Substanz gelegen ist. Im Laufe der Entwicklung konzentriert sich die Substanz der Schichtkugel in eine einzige periphere Schichte, die einen verdünnten Innenraum umschließt.

Bringt man nun solche Zellen in ein Nährmedium, so tritt keine Aussprossung der Schichtkugel ein. Es bilden sich vielmehr 2 bis 3 dichtere Stellen auf derselben aus, worauf dann ein Zerbrechen der äußeren Schichte in Teile erfolgt. Von diesen Teilen lösen sich lichtbrechende Granula ab, die Kokkenform annehmen und sich vermehren (Abb. 9, 10).

Bevor noch auf diese Vorgänge eingegangen wird, sollen Versuche beschrieben werden, die bezweckten, durch Vitalfärbung der Zellen die Zugehörigkeit der in den verschiedenen Entwicklungsphasen hervortretenden Elemente zu bestimmten Systemen erkennbar zu machen.

Die Hefe gehört ja bekanntlich zu jenen Versuchsobjekten, die zur Vitalfärbung oft herangezogen werden. Strugger, Drawert, Bautz, Marquardt, Gutz, Bogen, Metzner, Müller, Kärber, Mühlethaler, Steiner und Heinemann, G. Schwartz und andere Autoren versuchten durch Vitalfärbung mit Fluorochromen die Feinstruktur des Plasmas, vor allem die Struktur und Funktion der Hefegranula zu erforschen. Steht doch die Frage, ob in der Hefe ein Granulatyp oder mehrere vorliegen, oder ob es sich um verschiedene Zustandsformen ein und desselben Zell-

organells handelt, im Vordergrund des Interesses. Bei diesen färbeanalytischen Versuchen wurden meist junge, plasmareiche Zellen herangezogen.

Ich wählte bei meinen Farbversuchen außer jugendlichen vor allem ausgereifte Zellen, bei denen bereits Vakuolen und Zelleinschlüsse größerer Art zu sehen waren, ferner die hungrigen, stark belüfteten Zellen vom Gipsblock und parallel dazu Zellen, die längere Zeit in ausgeschöpften Medien lagen. Schließlich untersuchte ich auch noch Zellen, die vom Gipsblock weg auf einen Nähragarfilm kamen, um nach kurzer Zeit neuerlichem Nahrungsmangel und der schädlichen Einwirkung der Stoffwechselprodukte ausgesetzt zu werden. Es gelangten also Zellen in den unterschiedlichsten biologischen Zuständen zur Vitalfärbung.

Die Beobachtungen wurden mit einem Reichert-Zetopan im Hellfeld durchgeführt. Eine Fluoreszenzeinrichtung stand nicht zur Verfügung.

Zunächst wurden orientierende Versuche mit verschiedenen Farblösungen an Zellen einer mehrere Tage alten Agarkultur angestellt. Die Farblösungen erhielt ich aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Wiener Universität, wofür ich noch herzlich danke.

Mit Nilblau gefärbt, boten die Zellen ein so eindrucksvolles und anscheinend auch aufschlußreiches Bild dar, daß ich mich für diesen Farbstoff für meine Versuche entschied. Außerdem gehört Nilblau zu jenen Farbstoffen, die Fettreaktionen ergeben, was für die Darstellung der Entwicklungsphasen der Kugel von Wichtigkeit war.

In jungen Zellen der *Cand. alb.* färbten sich die Granula blau an. Auch in den Mycelfäden trat nur Blaufärbung der Granula ein, während alle anderen Zellbestandteile ungefärbt blieben. Es war dies dasselbe Bild, das sich bei den Färbversuchen der verschiedenen Autoren an jungen Hefezellen darbietet.

In Zellen, die schon gröbere Einschlüsse erkennen ließen, färbte sich die Membran hellblau, die Vakuole lila und die im ungefärbt bleibenden Plasma liegenden Granula dunkelblau an. Die grünliche Kugel behielt entweder ihre Farbe bei oder färbte sich von innen heraus gelb an. Die Zeitdauer der Anfärbung war dabei verschieden. Diese konnte momentan erfolgen oder erst nach einigen Minuten eintreten. Je inhaltsärmer die Zelle ist, desto rascher tritt der Farbeffekt ein und um so intensiver und dunkler wird das Gelb der Kugel. In optisch leeren Zellen und in solchen, die bereits eine Öffnungsstelle aufweisen, färbt sich die Kugel momentan tief orange an. Solche Zellen können sich in einem Nährmedium nicht mehr restituieren.

Höfler und Diskus konnten an Algenzellen feststellen, daß der Farbstoff erst im Moment des Zelltodes Eingang in die Fetttropfen findet und diese orange anfärbt. Die Orangefärbung des Fettes stellt demnach physiologisch eine Todesreaktion dar.

Auch bei *Cand. alb.* gibt das Anfärbevermögen der Kugeln für Nilblau ein sehr klares Bild über den biologischen Zustand der Zellen.

Um die schädigende Wirkung des Nilblaus auf die Zellen von *Cand. alb.* feststellen zu können, wurde auf einem mit Würzeagar versehenen Objektträger je ein Tröpfchen von sterilem Wasser und ein Tröpfchen Nilblau

aufgetragen, in beide Hefezellen eingebracht und hierauf das Präparat verschlossen.

Die im Wasser befindlichen Zellen nahmen alsbald ihre Lebenstätigkeit auf und bildeten bereits nach 3 bis 4 Stunden die ersten Sprosse aus.

Die dem Farbstoff ausgesetzten Zellen färbten sich sogleich an, doch bildete sich die Gelbfärbung der Kugel nach kurzer Zeit wieder zurück, während die Blaufärbung der Granula mehrere Stunden bestehen blieb. Von einer Sproßtätigkeit war zunächst nichts zu bemerken. Erst nach etwa 5 Stunden begannen einzelne Zellen und frei liegende Kugeln Sprosse anzusetzen.

Sechs Stunden nach dem Auftragen auf dem Agar löste ich vorsichtig den Vaselineverschluß und setzte nochmals ein Tröpfchen Nilblau zu. Sofort trat intensive Gelbfärbung der Kugeln ein und auch das Blau der Granula vertiefte sich. Die aus den Zellen ausgetretenen Kugeln färbten sich mit ihren Sprossen gelb an. Das Präparat wurde sofort wieder verschlossen und weiter bebrütet.

Nach 3 Tagen waren die Zellen zwar deformiert, hatten aber Sprosse ausgebildet. Nach nochmaligem Zusetzen von Nilblau trat keine Gelbfärbung der Kugeln mehr ein, doch zeigte sich wieder der sonderbare von innen ausgehende Glanz. Die Granula und die Vakuolen färbten sich hingegen deutlich an. Auf einen neuen Nährboden übertragen, trat normales Wachstum der Zellen ein.

Es zeigte sich also, daß die Färbung mit Nilblau zwar eine Hemmung der Lebensprozesse bewirkt, diese jedoch nicht zum Stillstand bringt.

Bei den Vitalfärbungen konnte stets beobachtet werden, daß sich nicht alle Zellen eines Präparates anfärbten. Obwohl das zytologische Bild des Materiales ein ziemlich einheitliches war, blieb immer ein Teil desselben ungefärbt. Dabei war der Anteil der ungefärbten Zellen bei den jüngeren, plasmareichen Zellen wesentlich höher als bei den älteren.

Dieses auffallend verschiedene Verhalten bezüglich der Farbstoffaufnahme hatte bereits Gutz an Mucorzellen beobachtet. Schwartz kam bei ihren fluoreszenzoptischen Untersuchungen mit Acridinorange zur selben Beobachtung.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß ähnliche Prozesse der Reversibilität, wie ich sie bei der Kugelfärbung beobachten konnte, auch bei der Granulafärbung vorliegen, jedoch so rasch vor sich gehen, daß sie nicht erkennbar sind. Auch scheint der Zustand der Zellwand auf den Färbeprozess von Einfluß zu sein.

Ich untersuchte noch den Einfluß des pH-Wertes der Nährlösungen auf den Färbeprozess.

In Medien mit höheren pH-Werten färbte sich die Hefe intensiver an und war auch weniger empfindlich der Farblösung gegenüber, als dies in Medien mit niedrigerem pH der Fall war. Während die Blau- und Gelbfärbung in den verschiedenen pH-Bereichen nur Intensitätsunterschiede zeigten, waren in den Vakuolen auch Unterschiede in der Farbtönung zu sehen, doch konnte ich auf diese Feinheiten nicht näher eingehen.

Nach diesen Vorversuchen begann ich mit der Vitalfärbung der Hefezellen.

Es wurden zunächst Zellen einer jungen Würzekultur in ein Tröpfchen Nilblau (Grübler) 1 : 10.000 eingebracht. Der pH-Wert betrug 5,8. Nach 1 bis 2 Minuten trat in den plasmareichen Zellen Blaufärbung der Granula ein. In den Präparaten fanden sich auch immer Mutterzellen vor, die große Vakuolen mit tanzenden Körperchen aufwiesen. Diese Körperchen färben sich gelb oder blau an oder blieben ungefärbt, sie scheinen also verschiedener Natur zu sein.

In Zellen, die bereits 3 oder 4 Tage auf Würzeagar gewachsen waren, färbte sich die Membran hellblau an. Außer der Kugel, die sich nicht anfärbte, aber von einem inneren Glanz erhellt war, fand sich oft noch ein zweiter ungefähr gleich großer kugelig Körper vor, der sich dunkelblau färbte. Manchmal war noch eine dritte glashelle Kugel zu sehen.

Die Konturen der blau gefärbten Kugel verwischten sich allmählich, und ihr anliegend wurde ein sich blau anfärbendes scheibenförmiges Gebilde sichtbar (Abb. 13).

Aus der verschiedenartigen Farbreaktion der beiden Kugeln geht hervor, daß dieselben von unterschiedlicher Beschaffenheit sind und somit zwei Organellen darstellen.

Um Einblick in die Bedeutung dieser Organellen zu erhalten, wurden die Entwicklungsstadien der Kugel nun in vital gefärbten Zellen verfolgt.

In den optisch leeren Zellen der Gipsblockkultur trat momentan Orange-färbung der Kugel ein. Waren einige Kugeln in der Zelle vorhanden, so färbten sich alle gleich gelb an, und auch die außerhalb der Zelle liegenden Kugeln und Kügelchen zeigten Gelbfärbung.

In den Zellen, die bereits eine Schichtkugel enthielten, färbte sich deren Randschicht dunkelgelb an. An diese schloß sich eine heller gefärbte gelbe Binnenschicht an, aus der ein zentral gelegener Kern gelb leuchtend hervorstach. Die in der Zelle abgesproßten oder bereits ausgetretenen Schichtkugeln färbten sich in derselben Weise an.

Übertrug man Zellen vom Gipsblock auf Würzeagar, so trat nach ungefähr zwei Stunden bei einem Teil der Zellen die Kugel aus und begann zu sprossen. Kugel und Sproß färbten sich gelb an. Auch die nächste Generation färbte sich meist noch gelb an, während die folgenden Sprosse keine Anfärbung mehr zeigten und grün blieben.

Füllt die Kugel aber die Zelle zur Gänze aus, so färbt sich innerhalb der hellblauen Membran die Kugel gelb an und sproßt nach 2 Stunden eine oder zwei gelb gefärbte Kugeln ins Außenmedium ab. Die Sproßkugeln lösen sich ab, und jede bringt neue Kugelsprosse hervor, die sich nicht mehr anfärben.

Ist die Kugel von der Membran noch durch eine schmale Binnenschicht getrennt, so schließt sich der hellblauen Membran ein tief orange gefärbter Ring an, dessen Innenraum dunkel blauviolett gefärbt ist. Diese Farbe rührt von stark tingierbaren, teils runden, teils stäbchenförmigen Elementen her, die in einer hellen Substanz eingebettet liegen. Wie ich bei der Czapa-

Iewski-Färbung schon erwähnte, habe ich die Weiterentwicklung dieser Zellen noch nicht verfolgen können (Abb. 11).

Zumeist sieht man in der ziemlich inhaltsarmen und strukturlosen Zelle eine große gelb gefärbte Kugel liegen, die innerhalb der Zelle einen großen Sproß ausbildet. Dieser ist meist wieder gelb gefärbt, kann aber auch ungefärbt bleiben. Die nachfolgenden Sprosse nehmen den Farbstoff nicht mehr an und sind grünlich. Es erfolgt so eine allmähliche Entleerung der Kugel durch Absprossung. Vielfach sind dann in den Zellen nur mehr ein oder zwei kleine gelbe Kügelchen zu sehen.

In Zellen aber, wo außer der großen Kugel und dem sie umgebenden hellen Bereich noch Plasmareste vorhanden waren, trat Rückbildung der Kugel ein, und die Zelle bekam wieder ihr normales Aussehen. In solchen Zellen erfolgt die Anfärbung nicht momentan, vielmehr tritt nach Färbung des mittleren Teiles der Kugel ein langsames Herausreifen der gelben Farbe bis in die peripheren Schichten ein. Die Anfärbung kann sich nun bis an die Oberfläche erstrecken, oder es bleibt eine äußere Schichte ungefärbt, durch die das Gelb durchschimmert.

Aus der immer wieder zu beobachtenden Erscheinung der sukzessiven Anfärbung der Kugel von innen heraus kann geschlossen werden, daß trotz des homogenen Aussehens derselben in ihr bereits eine Differenzierung erfolgt ist, oder sich in ihrem Innern ein kernförmiger Einschuß befindet.

Während des Anfärbeprozesses tritt unvermittelt das Granulum aus der Kugel aus und färbt sich dunkelblau an. Es liegt zunächst in der hellen Zone, schiebt sich dann mehr und mehr an das Plasma heran und tritt in dasselbe ein.

In dem Maße, als sich die Granulasubstanz ausweitert und farblos wird, treten zahlreiche kleine dunkelblaue Körnchen im Plasma ins Blickfeld. Das Gelb der Kugel hat sich während dieses Vorganges zurückgebildet, und erst in dem Zeitpunkt, wo die Granula im Plasma sichtbar werden, beginnt die Kugel zu sprossen.

Die zeitliche Aufeinanderfolge in der Entwicklung der beiden Organellen ist wohl der unmittelbare Ausdruck für die Koordination ihrer Funktionen.

Hat die Kugel wieder ihre natürliche grünliche Farbe angenommen, so beginnt sie an einer oder auch an zwei Stellen Sprosse auszubilden. Mitunter ist der erste Sproß noch gelb gefärbt. Anscheinend war zum Zeitpunkt der Sprossung die Rückbildung des Farbstoffes noch nicht in allen Teilen der Kugel eingetreten. Meist sind die Kugelsprosse grün und kleiner als die vorhergegangenen. Die weiteren Sprosse werden immer kleiner und verlieren sich schließlich in der Struktur des Plasmas.

Mit dem Auftreten des ersten Granulums zeigt sich bereits eine Verkleinerung der Kugel, die mit eintretender Sproßbildung ihren Fortgang nimmt. In Zellen, bei denen sogleich bei Beginn des Färbeprozesses die blaue Scheibe sichtbar war, tritt niemals Anfärbung der Kugel ein.

Es wurden auch Zellen jüngeren Entwicklungsstadiums gefärbt, bei denen der Zustand der Aussprossung der Kugel und die Bildung des ersten Granu-

lums noch nicht erreicht war. In Zellen, bei denen in den Winkeln zwischen Zellwand und der großen Kugel ein minimaler Plasmarest lag, färbten sich die darin allmählich sichtbar werdenden Kügelchen mit Nilblau nicht an. Nur jene Granula, die in den nunmehr sich ausspannenden Plasmafäden auftraten, nahmen den Farbstoff an und färbten sich blau.

Aufschlußreich erschien mir der Fall, wo feine Kügelchen am Rande der hellen Zone im Plasma lagen. Diese zarten Gebilde färbten sich blau, reihen sich aneinander und umschließen bogenförmig die Plasmagrenze. Der Bogen verbreitert sich, und sogleich werden die blauen kleinen Granula wieder im Plasma sichtbar.

Nunmehr bildet sich von der Kugel ausgehend ein das Plasma durchziehendes, glashelles, schaumiges Netz aus, in dessen Maschen die blauen Granula sichtbar sind. In der hellen Substanz des Netzes treten keine dichteren Einschlüsse auf, und alsbald entschwindet es selbst der Beobachtung. Die große Kugel färbte sich in diesen Zellen nicht an. Sie hatte sich mehrmals ruckartig verkleinert und liegt nun als kleine, glänzende Kugel in der normal aussehenden Zelle.

Die Durchführung von Vitalfärbungen ließ meine Beobachtungen der verschiedenen Lebensphasen der Hefezelle und die dabei auftretenden Zustandsformen ihrer Organellen besonders deutlich in Erscheinung treten. Ich möchte an dieser Stelle Herrn Professor Dr. K. Höfler vielmals danken, der mich dazu anregte, auch diese Methode bei meinen Untersuchungen in Anwendung zu bringen.

Im folgenden sollen nun die Beobachtungen über die Entstehung der lichtbrechenden Granula in den Zellen von *Cand. alb.* und ihre Entwicklung zur Kokkenform beschrieben werden, liegt doch der vorliegenden Arbeit gerade diese Fragestellung zugrunde.

Wie bereits erwähnt, lösen sich Zellen, die vom Gipsblock in Bouillon übertragen wurden, alsbald auf und die dabei freiwerdenden Granula treten ins Außenmedium aus. Hier nehmen sie nach einiger Zeit Kokkenform an und beginnen sich zu vermehren. Dieselbe Beobachtung konnte auch an jenen Granula gemacht werden, die sich aus den Bruchstücken der Schichtkugel ablösten.

Mein Bestreben ging nun dahin, Einblick in die Entstehung dieser Granula zu bekommen.

Bei den Versuchen, wo Zellen des Gipsblockes auf einen Würzeagarfilm zur Dauerbeobachtung kamen, tritt entweder Sprossung der Kugel ein, oder es erfolgt die Restitution der Zelle. Durch die abermalige Verschlechterung der Lebensbedingungen beginnen sich nach 3 bis 5 Tagen Veränderungen in der Zelle bemerkbar zu machen.

Um die Zellen zu einer rascheren Reaktion zu zwingen, verstärkte ich bei den folgenden Versuchen den bereits geschilderten Notstand noch dadurch, daß ich die Zellen nicht mehr auf Würzeagarausstriche, sondern auf solche von Fleisch-, Lactose- und Harnstoffagar brachte. Auch auf diesen Substraten erholten sich die Zellen, doch nach 1 bis 2 Tagen begannen die Auflösungserscheinungen im verstärkten Maße einzusetzen (Abb. 17—26).

In Zellen mit normalem Aussehen kommt es zu keiner Größenzunahme der Kugel, sondern zur Ausbildung einiger kleinerer Kugeln, die sich mit Nilblau gelb anfärben. Manche Zellen sind geradezu angefüllt mit solchen Kugeln, die durch eine Substanz miteinander verbunden erscheinen.

Befand sich in den Zellen bereits eine große Kugel, so kam es zu keiner Aussprossung, sondern es bildeten sich innerhalb derselben 2 bis 4 kleinere Kugeln aus.

Hatte die Kugel bereits eine Reihe von Sproßkugeln ausgebildet, so konnte das Auftreten einer Teilungslinie beobachtet werden, die durch alle Kugeln hindurchging und jede derselben in zwei Hälften teilte. Bevor aber noch die Trennung der Kugeln eintrat, zerfiel jede Hälfte unvermittelt in 2 oder 3 kleine Körperchen. Diese liegen zunächst noch an der Trennungslinie, lösen sich dann allmählich von ihr ab und treten aus der Zelle aus.

In den Kugeln und auch in den Kugelsprossen beginnen nun Auflösungserscheinungen einzusetzen.

Aus der peripheren Kugelschicht scheinen Teilsubstanzen in Lösung zu gehen. Die Kugel wird dabei flacher, und ihre Kontur ist nicht mehr scharf umgrenzt. Damit werden die Vorgänge im Innern der Kugel einer Beobachtung zugänglich.

Obwohl ich über den Zellkern und seinen Bau noch keine Aussage machen kann, ist anzunehmen, daß die Kernsubstanz in der Kugel eingeschlossen ist. In mancher der beobachteten Zellen befinden sich in der aufgelockerten Kugelsubstanz zwei Körperchen, die anscheinend durch Kernteilung hervorgegangen sind. Diese Körperchen teilen sich neuerdings und ergeben nach fortgesetzten Teilungsschritten schließlich die lichtbrechenden Granula. Bei diesem Vorgang wird die Kugelsubstanz mit aufgebraucht, sie wird zunächst lockerer, dann schaumig. Offenbar bauen sich also die Granula aus Teilchen der Kernsubstanz auf, die von Kugelsubstanz umschlossen sind.

Nach Austritt der Granula bleibt in der Zelle ein grünliches, oftmals geknittert erscheinendes Häutchen zurück. Der Austritt der Granula aus der Zelle kann einzeln vor sich gehen oder kann geschlossen erfolgen.

Finden sich in der Zelle bereits Kugelsprosse vor, so treten in diesen ebenfalls Auflösungsprozesse ein, bei denen es auch zur Bildung der Granula kommt.

In ein Nährmedium gebracht, vergrößern sich die Granula und werden zu Kokken. Diese verflachen sich, und aus der Breitseite sproßt ein neues Individuum hervor und aus diesem wieder eines. Es entstehen so kurze Ketten von einigen Gliedern, wobei die jüngeren Kokken kleiner als die älteren sind (Abb. 27, 28).

In der ersten Kokke bildet sich nun oftmals eine Querwand aus, die senkrecht zur Sproßrichtung verläuft. Die Kokke löst sich vom Zellverband ab, und in dem Maße, als sie sich vergrößert, wird sie von der Querwand mehr und mehr eingeschnürt, so daß schließlich eine Diploform entsteht. Manchmal treten aber auch zwei kleine Kokken zusammen und bilden eine Diplokokke.

Die zunächst ungleichen Teilkokken wachsen zur gleichen Größe heran,

worauf neuerdings Querwandbildung eintritt. Die neue Teilungsebene steht dabei senkrecht zu ersterer. Werden von diesem Vorgang beide Teile gleichmäßig erfaßt, so bildet sich eine Tetrade aus. Dieser Vermehrungsprozeß findet seinen Fortgang, wobei es zu flächenartigen oder haufenförmigen Zellverbänden kommt.

Bei jedem meiner zahlreichen Versuche traten stets einzelne Kokken, Diplokokken, Tetraden und größere Zellverbände nebeneinander auf, wobei je nach der Art des Nährmediums der eine oder andere Typ mehr in Erscheinung trat.

Die Kokken zeigen keine Eigenbewegung und sind grampositiv. Sie bilden glatte, cremefarbige Kolonien aus und konnten auf vielen Nährböden kultiviert werden.

Geeignete Nährböden sind: Dextrose-, Fleisch-, Lactose- und Peptonagar, ferner Dextrose-, Standard- und Nährbouillon und Peptonwasser. In den flüssigen Medien bekamen die Kulturen schleimigen Charakter und färbten sich gelb.

Ich versuchte nun, durch Kultivieren der Organismen auf verschiedenen Nährböden zur Hefeform zurückzukommen. Es gelang bisher nicht, wenn auch in manchen Substraten überraschend große Formen zur Entwicklung kamen.

Mit Nilblau färben sich die Kokken blau an. Sie besitzen eine starke Außenschichte, die bei der Diploform nur mehr in Bruchstücken der peripheren Schichte anlag und bei der folgenden Generation überhaupt nicht mehr zu sehen war. Im Innern der Kokken färbte sich ein kleines Körperchen dunkelblau an.

Nach diesen morphologischen Ergebnissen untersuchte ich, ob im Kohlehydratstoffwechsel der Hefe und dem der Kokkenform Unterschiede bestehen. In Parallelreihen wurde die Assimilations- und Vergärungsfähigkeit beider Formen an 12 Kohlehydraten überprüft. Die Hefe vermochte in mehr oder minder hohem Grade folgende Zucker zu vergären: Dextrose, Dextrin, Galaktose, Lävulose, Maltose und Saccharose, die Kokkenform darüber hinaus noch Arabinose, Lactose, Mannit und in ganz geringem Maße auch Raffinose, Stärke und Glycerin. In diesen verschiedenen Substraten waren in der Entwicklung der Kokken nur Unterschiede in der Größe und dem Vermehrungsgrad zu sehen. Bei der Hefe trat in manchen Zuckern sofort Mycelbildung ein und die Form desselben schien für bestimmte Zuckerarten geradezu spezifisch zu sein.

Besprechung der Ergebnisse

Über das Auftreten kokkenartiger Entwicklungsformen bei Hefen wurde schon von verschiedenen Autoren berichtet. Die Versuche wurden entweder an physikalisch oder chemisch abgetöteten Zellen durchgeführt oder an lebenden Zellen, die sich bereits im Auflösungszustand befanden. Die aus den Zellen ausgetretenen Granula nehmen kokkenartige Gestalt an und beginnen sich zu vermehren. Nach Berichten einiger Autoren bilden sie sich nach einiger Zeit wieder zur normalen Hefeform um.

Hest (1907) war vielleicht der erste Autor, der über das Zustandekommen von lebensfähigen Plasmateilchen, den Pseudozellkernen, berichtete, die sich wieder zu Hefeformen entwickelten.

Jonač berichtete 1930, daß Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* durch Hitze oder Formalinbehandlung nicht abgetötet, sondern in einen Zustand der Latenz versetzt werden, in dem die Zellen keine Lebensäußerungen mehr zeigen. Das Plasma ist dabei dünn und homogen. Überträgt man jedoch solche abiogene Zellen in Würze, so zeigen sie wieder Lebenstätigkeit und es kommt eine „Kleinform“ der Hefe zur Entwicklung. Aus dieser können sich noch kleinere, von Jonač als „Bakterienform“ bezeichnete Zellen entwickeln.

Beläßt man die „Kleinform“ lange Zeit hindurch im gleichen Substrat, so nehmen vereinzelte Zellen wieder normale Größe an. In diesen Zellen können nun Granula, die „Sporoidkörperchen“ zur Entwicklung kommen. Die Sporoidkörperchen treten aus der Zelle aus und vermehren sich durch Sprossung. Die neue Generation besteht aus sehr kleinen Zellen, bei denen erst später die Zellwand zur Entwicklung kommt.

In Einklang mit den Beobachtungen Jonač stehen Untersuchungen, die in jüngster Zeit von G. Schwartz (1959) an *Saccharomyces* durchgeführt wurden. Schwartz konnte feststellen, daß durch Zugabe von Acridinorange zur Nährlösung von Hefezellen, diese, in ihrer Entwicklung gehemmt, eine Latenzzeit durchmachen, an die sich eine Phase erhöhter Vermehrungstätigkeit anschließt. Es gelangen dabei zwei an Größe verschiedene Zellformen zur Entwicklung, die sich als vegetative Mutanten erwiesen. Die dominierende Form ist dabei eine Kleinhefe, die physiologisch und morphologisch große Übereinstimmung mit der von Jonač beschriebenen Kleinform zeigt. Offenbar handelt es sich bei der von Jonač beobachteten Klein- und Bakterienform ebenfalls um Mutanten der vorbehandelten Hefe.

Die von ihm beschriebenen Sporoidkörperchen scheinen mit den Pseudozellkernen von Hest identisch zu sein.

1939 konnte Baltatu bei *Mycoderma*-Arten Sporenbildung beobachten und beschreibt auch das Auftreten von sporoiden Körperchen, die den von Hest und Jonač beschriebenen entsprechen. Diese sporoiden Körperchen entwickelten sich zu einer Kokkenform, doch konnte eine Rückbildung zur Hefe nicht erreicht werden.

Ähnlich berichtet Schanderl 1951 über die Entstehung kokkenartiger Formen bei Kahlmhefen.

Kleber und Hoffmann stellten 1953 fest, daß sich die aus Bierhefe ausgetretenen Granula zu tetradenbildenden Kokken entwickeln, die weitgehende Übereinstimmung mit der in Bieren auftretenden „Biersarcina“ zeigen.

Ich konnte bei meinen Versuchen mit verschiedenen Hefearten wiederholt die Beobachtung machen, daß Zellen infolge ungünstiger Umweltsbedingungen Lebenszustände erreichen können, bei denen Granula zur Entwicklung kommen, die sich als lebens- und entwicklungsfähige Individuen erweisen. Diese Entwicklungsformen konnte ich sowohl bei s p o r o-

genen als auch bei asporogenen Hefen beobachten. Die aus den Granula sich entwickelnden Organismen waren bei den meisten Hefearten von kokkenartiger Gestalt, bei vereinzelt Arten aber auch stäbchen- oder kommaförmig.

Meine Untersuchungen an *Cand. alb.* haben mich nun Einblicke in die Entstehung und das Wesen der „lebensfähigen Granula“ gewinnen lassen.

Es hat sich gezeigt, daß *Cand. alb.* unter ungünstigen Lebensbedingungen imstande ist, in einem als Reservestoffbehälter wirkenden Organ lipoiden Granula auszubilden, die sich als lebensfähige Entwicklungsformen der Hefe erwiesen.

Die in jeder Zelle sich vorfindende kleine Fettkugel beginnt bei Eintritt schlechter Lebensverhältnisse an Größe zuzunehmen, während das sie umgebende Plasma gleichzeitig inhalts- und substanzärmer wird.

Die Beobachtungen haben eindeutig gezeigt, daß die Größenzunahme der Kugel keinem Wachstumsvorgang entspricht, sondern durch das Eindringen bestimmter Zellelemente und offenbar auch von Kernsubstanz zustande kommt. Die vergrößerte, aber homogen erscheinende Kugel zeigt bei Vitalfärbung mit Nilblau bereits eine Differenzierung in eine Innen- und Außenschicht. Die innere Schicht tritt durch besonderen Glanz hervor, während die äußere unverändert grünlich erscheint. Da in normalen Zellen die Kugelsubstanz mit Nilblau keine Anfärbung zeigt, gewinnt man den Eindruck, daß die in die Kugel eindringenden dichten Zellelemente die Kugelmaterie an die Peripherie abdrängen, während sie selbst den Innenraum der Kugel einnehmen.

Es konnte der Reifungsvorgang der Kugel in aufeinanderfolgenden Phasen verfolgt werden.

Nach Rückführung der Zellen in normale Lebensverhältnisse treten die einzelnen Entwicklungsstadien der Zelle und der Kugel in ihrem Wechselspiel in aller Deutlichkeit in Erscheinung. Äußerlich kommen diese Veränderungen in der Anfärbbarkeit mit Nilblau und der eintretenden Strukturbildung der Kugel zum Ausdruck. Der Lebenszustand der Zelle ist an dem Grad der Tingierbarkeit erkennbar.

Sind in der Zelle außer der großen Kugel noch Plasmareste vorhanden, so sind die in der Kugel stattgehabten Vorgänge reversibel und es tritt Restitution der Zelle ein. Es erfolgt dabei entweder ein sukzessives Austreten von diffusiblen Substanzen aus dem Innern der Kugel, oder aber es kommt zur Ablösung eines Granulums von der Kugel. Kugel und Granulum sind von einer hellen Zone umgeben. Das Granulum breitet sich nach Kontaktnahme mit dem Plasma aus und überzieht das ganze Plasmafeld und scheint in dasselbe einzudringen. In dem „erweckten“ Plasma treten als erste Strukturelemente kleine Granula auf, die mit der fermentativen Tätigkeit der Zelle in unmittelbarem Zusammenhang zu stehen scheinen. Nach erfolgter Reorganisation dieses Systems treten neuerlich Veränderungen in der Zelle auf.

Aus der Kugel treten entweder glashelle Substanzen aus, oder es kommt zur Ausbildung von Kugelsprossen, die, in stets kleinerer Gestalt ausge-

bildet, schließlich im Plasma aufgehen und dieses neuerdings prägen. Die Kugel wird bei diesem Vorgang ständig kleiner und erreicht wieder ihre ursprüngliche Größe und Beschaffenheit. Die ausgetretenen Stoffe scheinen andere zu sein als jene, die zur Bildung des Granulums führten, was durch ihre Anfärbbarkeit mit Nilblau erkennbar ist. Plasmagebunden, dürften diese Stoffe mit den Vorgängen der Eiweißsynthese zusammenhängen oder daran beteiligt sein. Nach Abschluß der beiden Vorgänge ist die Organisation des Plasmas wieder hergestellt und in den Zellen beginnen Wachstums- und Vermehrungsvorgänge einzusetzen.

Findet sich kein „aktives Plasma“ mehr in der Zelle vor, so sind auch die Lebensfunktionen der Zelle damit erloschen. Die Eigenständigkeit des Kugelorgans und vor allem seine Bedeutung treten nun in aller Deutlichkeit in Erscheinung.

Mit Erlöschen der Lebensfunktionen in der Zelle treten in der Kugel jene stofflichen Umgruppierungen ein, die zur Ausbildung von bisher nicht bekannten Entwicklungsformen bei *Cand. alb.* führen.

In solchen Zellen beginnt die große Kugel exogen oder endogen Sprosse auszubilden. Bemerkenswert ist dabei, daß die nachfolgenden Sprosse immer kleiner als die vorhergehenden sind und die Mutterkugel selbst an Größe verliert. Auch die in einem Nährsubstrat befindlichen Kugelsprosse nehmen nur wenig an Größe zu. Sie sind anscheinend also nicht imstande, jene fermentativen Prozesse durchzuführen, die Voraussetzung für den Aufbau der Leibessubstanz sind. In den großen Kugelsprossen tritt nach einiger Zeit eine schwache Differenzierung ihrer Substanz ein, während in den kleinen Kügelchen zwei bis vier dichtere Punkte hervortreten. Der Entwicklungsgang der im Außenmedium befindlichen und der in der Zelle verbliebenen Kugelsprosse scheint derselbe zu sein. Im Substrat finden sich nach einigen Stunden außer zahlreichen Kugeln und Kügelchen auch viele kleine Hefezellen vor, die vermutlich aus den verarmten Hefezellen hervorgegangen sind. Doch muß dieser Vorgang noch genauer untersucht werden.

S. Windisch konnte bei *Torulopsis (Candida) pulcherrima* beobachten, daß der in jeder Zelle vorhandene Öltropfen an Größe zunimmt und sich in zwei Hälften teilt. Die eine Hälfte tritt aus einem vorgestülpten Wandteil aus, der sich seinerseits nun von der Zelle ablöst und den ausgetretenen Tropfen umgibt. Die Tochterzelle entwickelt sich zu einem Ascus, in dem vier Sporen zur Ausbildung kommen. Windisch schreibt dazu: „... Die Sporen in den freien Ascis scheinen geradezu aus dem Öl gebildet zu sein ... Die regelmäßige Fetttropfenteilung läßt vermuten, daß mit dem Tropfen u. a. auch der Kern oder die Kerne der Zelle irgendwie zusammenhängen.“ Der entleerte Ascus rollt sich dann ein oder sitzt müthenartig der Mutterzelle auf. Vuillenun und Guerra, später auch Okabe, hatten ähnliche Vorgänge schon früher bei *Cand. alb.* festgestellt, doch damit keinen Glauben gefunden. Ich konnte bei meinen bisherigen Versuchen keine Ascusbildung mit Sporen in der geschilderten Weise beobachten. Doch ist es möglich, daß durch die überaus harten Bedingungen, denen die Hefe ausgesetzt war, die Voraussetzungen für die Sporenbildung

gestört wurden und es daher zu keiner Ausbildung derselben kam. Außerdem konnte die Entwicklung jener chlamydosporenartigen Zellen, die sich durch besondere Membranbildung auszeichnen, noch nicht verfolgt werden. Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß die Zellwand bei *Cand. alb.* trotz ihrer Dicke ein sehr labiles Organ darstellt.

Einen weiteren Schritt im Reifungsprozeß der Kugel stellt die Umbildung zu einer Schichtkugel dar. Diese vermag ebenfalls Sprosse hervorzubringen. Oftmals tritt aber ein Zerbrehen derselben in Teile ein, aus denen sich lichtbrechende Granula ablösen, die in einem neuen Medium zu Kokken werden und sich vermehren.

Bei Anhalten der harten Lebensbedingungen treten in den Kugeln und auch in den Kugelsprossen, die sich in der Zelle befinden, Auflösungserscheinungen ein, und man erhält Einblick in das bisher nicht einsehbare Kugelinere. Es sind Teilungsvorgänge, die hier sichtbar werden, aus denen die lipoiden Granula hervorgehen. Über die Kernverhältnisse selbst kann noch keine Aussage gemacht werden. Mit diesen Teilungsvorgängen geht auch ein Aufbrauchen der Kugelsubstanz einher, so daß jedes Granulum ein Kernteilchen darstellt, das von Kugelsubstanz umhüllt ist.

Die geschilderten Entwicklungsphasen zeigen die Unterschiede im Reifezustand der Kugel, wie sie durch die Dauer des Notstandes und die Verschiedenheit der Nährmedien hervorgerufen werden.

Die ausgetretenen Granula entwickeln sich zu Kokken, die sich zunächst durch Sprossungs- später auch durch Teilungsvorgänge vermehren. In älteren Kulturen treten oft sehr große Formen auf, doch konnte bisher die Rückbildung zur Hefeform nicht erreicht werden. Vielleicht ist der Mangel an membranbildender Substanz mit ein Grund, daß diese Zustandsform des Pilzes nicht eintritt.

Stoffwechselversuche haben gezeigt, daß die Kokkenform eine größere Anzahl von Kohlehydraten zu vergären vermag, als die Hefe dies imstande ist. Außerdem vermögen sie Milchsäure zu produzieren. Ob ein Zerfall der Kokken zu noch kleineren Lebenseinheiten führt, müssen spätere Versuche zeigen.

Es sei mir nun gestattet, Herrn Professor Dr. A. Janke für das große Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegenbrachte und seine wertvollen Hinweise herzlichst zu danken.

Herrn Professor Dr. A. Zeilinger, dem Vorstand des Milchwissenschaftlichen Instituts der Hochschule für Bodenkultur, der mir in bereitwilligster Weise die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut bot, sei mein aufrichtigster Dank ausgesprochen.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen an vier Stämmen von *Candida albicans* haben übereinstimmend zu folgenden Ergebnissen geführt:

In alternden und bei Eintritt ungünstiger Lebensbedingungen auch in normalen Zellen beginnt ein in den Zellen stets sich vorfindendes Kügelchen,

das Fettcharakter hat, an Größe zuzunehmen. Die Größenzunahme kommt durch das Eindringen von lebenswichtigen Substanzen der Zelle in das Fettkügelchen zustande.

Die in der Kugel nun einsetzenden stofflichen Umgruppierungen lassen aus dem bisher homogen erscheinenden Körper ein völlig neues Organ mit deutlicher Strukturbildung entstehen. Mit diesem Vorgang ist die sukzessive Verarmung der Zelle an Plasma verbunden, die schließlich zum Tod führen kann.

Sind im außerhalb der Kugel liegenden Protoplastenteil noch Plasmareste vorhanden, so treten nach Übertragen in ein Nährmedium Restitutionsprozesse ein, die das normale Zelleben wieder herstellen.

Durch Vitalfärbung mit Nilblau treten diese Vorgänge infolge verschiedener Farbreaktion besonders deutlich in Erscheinung.

Überträgt man hingegen Zellen, die kein aktives Plasma mehr enthalten, in ein Nährmedium, so treten keine Rückbildungsvorgänge ein. Die Kugel tritt jedoch nun als selbständiger Körper in ihrer ganzen Eigenartigkeit und Bedeutung hervor.

Das Kugelorgan beginnt exogen oder endogen Sprosse auszubilden, wobei es an Größe verliert. Die Kugelsprosse vermögen ebenfalls Sprosse hervorzubringen, die immer kleiner ausgebildet werden.

In nicht sprossenden Kugeln und auch in endogenen Kugelsprossen treten bei Anhalten der schlechten Umweltsbedingungen Teilungsvorgänge ein, die letzten Endes zur Bildung stark lichtbrechender „Granula“ führen. Diese entwickeln sich zu kokkenartigen Formen, die sich durch Sprossung und auch durch Teilung vermehren.

Die Rückbildung der Kokken- in die Hefeform konnte bisher noch nicht beobachtet werden.

Literatur

- Baltatu, Gh., 1939/40: Zbl. Bakt. II, 101, 196.
 Bautz, E., 1954: Ber. dtsh. bot. Ges. 67, 281.
 — 1956: Z. Naturforsch. 11 b, 26.
 Bautz, E., und H. Marquardt, 1953 a: Naturwiss. 40, 531.
 — 1953 b: Naturwiss. 40, 531.
 Bogen, H. J., 1953: Arch. Mikrobiol. 18, 2, 170.
 Cholnoky, B. und K. Höfler, 1950: S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl., Abt. I, 159, 143.
 Dangeard, P., 1919: C. r. acad. sci. Paris 169, 1005.
 Drawert, H., 1952: Ber. dtsh. bot. Ges. 65, 263.
 — 1953: Ebenda 66, 153.
 — 1940: Flora 154, 159.
 Drawert, H., und H. Gutz, 1953: Naturwiss. 40, 512.
 — und M. Kärber, 1956: Naturwiss. 43, 161.
 — und I. Metzner, 1956: Protoplasma 47, 359.
 Guilliermond, A. und R. Gautheret, 1938: C. r. cad. sci. Paris, séance du 20, 6.
 Gutz, H., 1956: Planta 46, 481.
 — 1957: Naturwiss. 44, 545.

- van Hest, J. J., 1907: Zbl. Bakt. II, 18.
Höfler, K., 1954: Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 455.
— 1957: Protoplasma 48, 1.
— 1949: Biol. gene. 19, 90.
— und Diskus, 1957: Protoplasma 48, 4.
Janke, A., 1924: Allgemeine Technische Mikrobiologie, Dresden: Th. Steinkopff.
— 1946: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, Dresden: Th. Steinkopff.
Jonač, V., 1950: Wschr. Brauerei 47, 18, 205.
Kärber, M., 1957: Arch. Mikrobiol. 29, 65.
Kleber, und U. Hoffmann, 1953: Brauwissenschaft, 7.
Langeron, M., und P. Guerra, 1938: Annales de parasitol. humaine et comparée 16, 36, 162, 429, 481.
Lodder, J., 1934: Die anascosporogenen Hefen, 1. Hälfte.
Mühlethaler, K., 1957: Naturwiss. 44, 204.
— 1955: Protoplasma 45, 264.
Müller, R., 1956 a: Mikroskopie 11, 36.
— 1956 b: Naturwiss. 43, 86.
— 1956 c: Ebenda 43, 428.
Okabe, Y., 1929: Zbl. Bakt. I, 111, 181.
Schanderl, H., 1951: Mikroskopie 6, 146.
— 1953: Ber. dtsh. bot. Ges. 66.
Schwartz, G., 1959: Dissertation Techn. Hochschule Braunschweig.
Smith, J., and W. Mair, 1911: Skand. Arch. Physiolog. 25, 247.
Steiner, M., und H. Heinemann, 1954 a: Naturwiss. 41, 40.
— 1954 b: Ebenda 41, 90.
Strugger, S., 1940: Naturwiss. 23, 97.
— 1947: Naturwiss. 34, 267.
— 1944: Flora 137, 73.
— 1954: Protoplasma 43, 120.
Vuillemin, P., 1898: C. Parasitol. 127, 650.
Weixl-Hofmann, H., 1959: Protoplasma 50, 3.
Windisch, S., 1938: Arch. Mikrobiol. 9, 551.
— 1940: Arch. Mikrobiol. 11, 368.

Über die Entstehung von Traubeschen Ferroferri-cyanzellen bei der Berlinerblau-Mikroreaktion auf Eisen

Von

Hans Pitschmann und Ferdinand Scheminzky

Aus dem Balneologischen Institut der Universität Innsbruck und dem Forschungsinstitut Gastein in Bad Gastein der Österreichischen Akademie der Wissenschaften
(Mitt. Nr. 201)

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Dezember 1959)

Im März 1958 entnahm der eine von uns (Sch.) aus dem Solebehälter auf dem Dachboden des Radium-Solbades Heidelberg eine Schlammprobe zur mikroskopischen Untersuchung auf Eisenbakterien, an welcher wir gelegentlich der Eisenfärbung eine eigenartige Beobachtung machen konnten.

Der Solebehälter wurde bis zur Unterbrechung des Badebetriebes im März 1957 durch eine Pumpe aus der 998 m tiefen Bohrung versorgt, welche in den Jahren 1913 bis 1918 abgestoßen worden war. Die geförderte Sole mit einer Temperatur von 25° C enthielt nach der Analyse von E. Müller (1939) rund 84 g gelöste feste Stoffe im Kilogramm des Wassers, unter denen die Natrium- und Chlor-Ionen mit fast 80 Millivalprozent überwiegen. Ferro-Ionen waren mit 91 mg/kg, Mangan-Ionen mit 2,6 mg/kg vorhanden.

Am Tage der Ortsbesichtigung und Probenahme war der Solebehälter praktisch leer; am Boden befand sich nur eine etwa 5 cm hohe, pastenartige feuchte Schlammmasse, deren oberflächliche Schicht die rötlichbraune Färbung des Eisenoockers zeigte. Unter dieser oberflächlichen Schichte hatte der Schlamm eine mehr braungraue Farbe. Uns interessierte die Frage, ob die schon an der Farbe erkennbare Eisenoockerablagerung rein anorganisch oder biologisch, durch Eisenbakterien, erfolgt; das letztere wäre bei der hohen Salzkonzentration der Sole bemerkenswert gewesen.

Die mikroskopische Untersuchung der rotbraunen Schicht ergab, daß neben zahlreichen Gesteinstrümmern — die offenbar mit der Sole aus der Tiefe heraufbefördert worden waren —, z. T. gröbere, z. T. feinere Eisenteilchen vorlagen (Abb. 1), ohne daß Anzeichen für eine bakterielle Eisenscheidung gefunden werden konnten. Bei der Ausführung der Berlinerblau-Mikroreaktion auf Eisen traten jedoch eigenartige, blau gefärbte Gebilde

hervor, welche auf den ersten Blick an auskeimende Sporen erinnern konnten (Abb. 2).

Die Berlinerblau-Mikroreaktion wird bekanntlich so ausgeführt, daß eine etwa 5%ige Lösung von gelbem Blutlaugensalz (Ferrocyankalium) mit der Probe auf einem Objektträger vermischt und nach kurzem Einwirkenlassen mit 5%iger Salzsäure versetzt wird. Beim Vorhandensein von Eisen entsteht eine Blaufärbung durch Bildung des unlöslichen Ferroferricyanides (Berlinerblau), mit welcher auch eine Lokalisation des Eisens möglich ist.

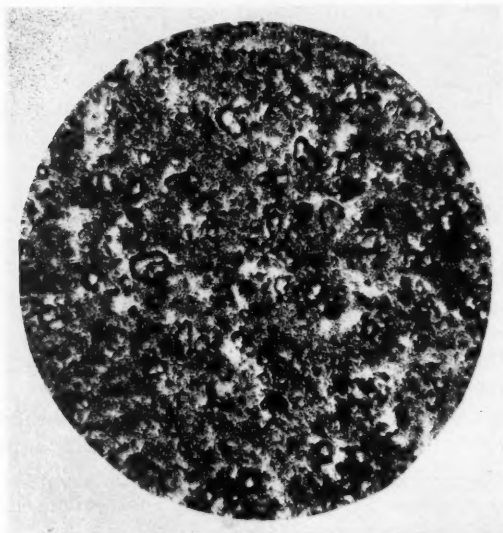


Abb. 1. Mikroskopisches Bild des der Untersuchung vorgelegenen Schlammes aus dem Solebehälter des Radium-Solbades Heidelberg: Gesteinssplitter, Kochsalzkristalle und feinst verteilte Eisenocker-Teilchen.

(Aufnahmedaten: Zeiss-Apochromat 10 \times , Zeiss-Photookular 4 \times , Grünfilter, Aufsatzkamera Miflex. Abb.-Maßstab der Nachvergrößerung 80 : 1.)

Diese „keimenden Sporen“ waren sehr stark blau gefärbt, zeigten also eine Eisenreaktion und bestanden aus rundlichen oder eckigen Körnchen von wenigen Mikren Durchmesser, aus denen ein z. T. durchsichtiger, z. T. nur durchscheinender, jedoch gleichfalls blauer Schlauch von 1–3 μ Länge ausgewachsen war (Abb. 2). Bei schneller Ausführung der Reaktion konnte nach Einschieben des Präparates unter das Immersionsobjektiv gerade noch das Auswachsen der Schläuche beobachtet werden; nach Erreichen des Zustandsbildes und der Größe, wie es etwa in den Aufnahmen der Abb. 2 festgehalten ist, blieben dann die Schläuche weiterhin an Größe und Form unverändert bestehen. Die Tatsache, daß im nichtgefärbten Präparat solche schlauchartige Gebilde fehlten, daß sie vielmehr erst bei Zusatz der Reagenzien für die Berlinerblaureaktion unter den Augen des Untersuchers

entstanden, kennzeichnete sie sofort als Kunstprodukte. Die schlauchförmige Gestalt, das Auswachsen aus einem Kern und der offensichtliche Aufbau der Schlauchmembran aus Berlinerblau-Substanz zeigte weiters an, daß es sich hier offenbar um osmotische Gewächse wie bei der

Ferrocyanakupferzelle nach Traube [1] handeln muß, allerdings im Bereiche mikroskopischer Dimension.

Wie der eine von uns (Sch.) in seiner „Physiologie der Traubeschen Ferrocyanakupferzelle“ [2] auf Grund der bisherigen Erkenntnisse ausgeführt hat, handelt es sich bei der Bildung solcher osmotischer Gewächse um folgenden Vorgang. Die Ferrocyanakupferzelle entsteht z. B. durch Einwerfen eines Stückes eines Ferrocyanalkaliumkristalles in eine Kupfersulfatlösung. An der Grenzfläche zwischen Lösung und Kristall bildet sich Ferrocyanakupfer als Niederschlagsmembran, die als semipermeable Haut nur Wasser aus der Flüssigkeit zum Kristall hindurchtreten läßt. Die Zunahme des Druckes im Inneren des Niederschlagsackes führt zu dessen Dehnung und zum Platzen, wobei die Membranbildner neuerlich in Berührung kommen und durch Niederschlagsbildung das Loch wieder

verschließen. Das Spiel von Wassereinsaugung, Dehnung, Platzen und Wundheilung geht eine Zeitlang weiter, so daß aus dem eingeworfenen Kristall schließlich ein schlauchförmiges Gebilde, eben die Ferrocyanakupferzelle, ausgewachsen ist.

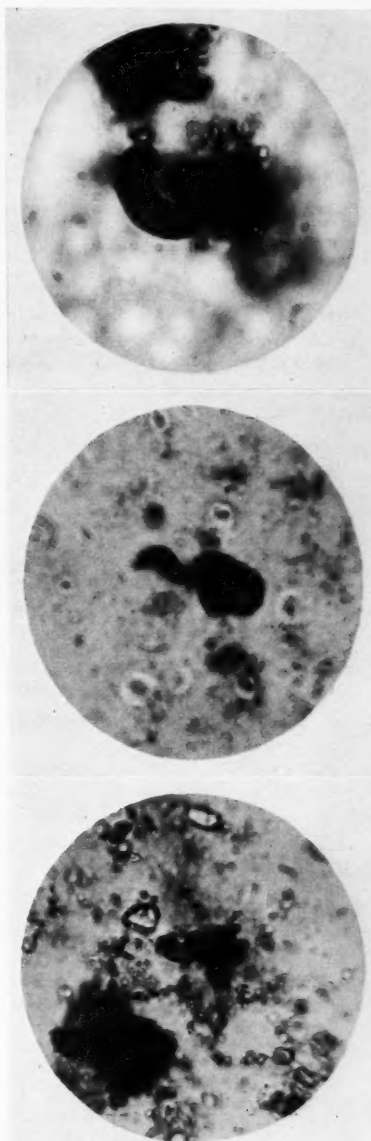


Abb. 2. Verschiedene Beispiele der im Schlamm von Abb. 1 bei der Berlinerblau-Färbung aufgetretenen Ferroferri-cyanzellen (Berlinerblau).

(Aufnahmedaten: Zeiss-Apochromat 90 \times (Immersion), Zeiss-Photokular 4 \times , Grünfilter, Aufsatzkamera Milflex. Abb.-Maßstab der Nachvergrößerung 720 : 1.)

Ein ganz ähnlicher Vorgang muß bei den in Abb. 2 dargestellten Gebilden Platz greifen. So wie die Ferrocyankupfermembran ist wohl auch eine Ferroferriyanmembran semipermeabel. Damit das Auswachsen des Schlauches zustande kommen kann, ist eine sackförmige Abscheidung des Berlinerblau und ein hoher osmotischer Druck im Inneren des Sackes erforderlich. In unserem Falle dienen offenbar Kristalle von Kochsalz als osmotisch wirksame Zentralkörper, die mit einem Mantel von Eisenocker umgeben sind. An diesem vollzieht sich die Abscheidung des semipermeablen Sackes aus Berlinerblau und der eingeschlossene Kochsalzkristall sorgt für die Einsaugung des Wassers aus der Umgebung. Da in dieser auch Ferrocyankalium und Salzsäure (als Löser des Ferri-Eisens) vorhanden sind, kann nach dem Aufplatzen des ausgewachsenen Schlauches auch eine Wundheilung stattfinden. Da bei den mikroskopischen Dimensionen der Vorrat an osmotisch wirksamem Kochsalz beschränkt ist, so erreichen diese Ferroferriyanzellen nur eine bescheidene (mikroskopische) Größe. Daß Kochsalzkristalle in dem untersuchten Schlamm vorhanden sind, hatte sich schon bei der mikroskopischen Prüfung gezeigt; ihr Vorhandensein ist auch sehr wahrscheinlich, weil der Solebehälter mit dem Rest der Sole rund ein Jahr Zeit gehabt hatte, auszutrocknen.

Wer solche osmotische Gewächse nicht aus eigener Erfahrung kennt, dem muß das Auftreten von Gebilden der beschriebenen Art unter dem Mikroskop („auskeimende Sporen“) vermutlich rätselhaft bleiben. Es erschien uns daher richtig, hier kurz auf diese Kunstprodukte hinzuweisen, die gelegentlich bei Ausführung von Berlinerblaureaktionen zum Eisennachweis in salzhaltigen Schlammen in Erscheinung treten können.

Zusammenfassung

Mit dem Kochsalzkristalle enthaltenden Eisenockerschlamme einer Solquelle wurde die mikroskopische Eisenreaktion mit Berlinerblau ausgeführt. Dabei traten Gebilde auf, die nach Form und Größe an auskeimende Sporen erinnerten. Sie konnten als osmotische Zellen im Sinne von Traube mit Mikrodimensionen erkannt werden (Ferroferriyanzellen). Die Entstehung dieser Kunstprodukte wird aufgeklärt.

Literatur

- [1] Traube, M.: Zentrbl. med. Wiss. 1866, 7 und 8; Arch. Anat. Physiol. 87, 1867; Ges. Abh. Berlin: Verlag Mayer & Müller, 1899.
- [2] Scheminsky, F., 1938; Protoplasma 31, 69.

Some Properties of a Contractile Protein in a Myxomycete Plasmodium¹

By

Hiromichi Nakajima

Department of Biology, Faculty of Science, and Institute for Protein Research,
Osaka University

With 18 Text-Figures

(Received January 19, 1960)

One of the fundamental problems in considering the mechanism of protoplasmic streaming is what kind of system is involved in the transformation of chemical energy into the mechanical work of streaming. What draws our attention to this subject is a contractile protein like actomyosin. It is broadly accepted that actomyosin plays an essential role in mechanochemical coupling in muscular activity. It is possible that the mechanism underlying muscular activity is applicable even in the case of protoplasmic streaming.

In the plasmodium of a myxomycete, *Physarum polycephalum*, there is vigorous streaming of the endoplasm which rhythmically reverses its direction. *Physarum* has no cell wall and can be grown in large quantities. Thus the plasmodium is a good material for a mechanochemical study of the mechanism of protoplasmic streaming.

Loewy (1952) first discovered an actomyosin-like protein in the plasmodium of *Physarum polycephalum*. Later, Ts'o et al. (1956 a, b, 1957 a, b) obtained an adenosinetriphosphate (ATP)-sensitive protein in this organism. This they purified by successive salt-fractionation and differential centrifugation and named myxomyosin. They studied its properties in detail with special emphasis on the physico-chemical properties.

In the present work a contractile protein was prepared from the myxomycete plasmodium by a procedure used for the preparation of myosin B² from rabbit skeletal muscle. This paper describes some of the properties of this protein.

¹ Supported by a Grant in Aid from the Ministry of Education.

² In the present work, the term myosin B is used for natural actomyosin extracted with Weber-Edsall solution (Szent-Györgyi 1951a).

Materials and Methods

Plasmodia of myxomycete, *Physarum polycephalum*, were grown in moist Petri dishes (30 cm. in diameter, 5 cm. in depth) on filter paper in the dark at about 20° C. Oatmeal was added daily (Camp 1936) until the plasmodia spread over the wet filter paper. Then no more oatmeal was added and after a day or two the plasmodia moved to the surface of the water and crept up the inner surface of the Petri dish. These plasmodia were relatively free from bacteria and protozoa and from the slime secreted by the plasmodium. They were then harvested.

Preparation of Materials. The material prepared by a method similar to that used by Szent-Györgyi (1951 a) for the preparation of myosin B from rabbit skeletal muscle. About 30 gm. of plasmodia were homogenized in a glass Potter-Elvehjem homogenizer with a small volume of ice-cold Weber-Edsall solution (0.6 M KCl, 0.01 M Na₂CO₃, 0.04 M NaHCO₃). The homogenate was then suspended in about three volumes of Weber-Edsall solution and left in the refrigerator (2°-4° C.) for about 5 hours. The extract was centrifuged and filtered with suction through filter paper. The pH of the filtrate was adjusted to about 6.5 with dilute acetic acid. It was diluted with about seven volumes of ice-cold water. After standing overnight in the refrigerator, the resulting precipitate³ was centrifuged, washed twice with ice-cold 0.03 M KCl (0.02 M histidine buffer, pH 6.4), and dissolved in KCl at a final concentration of 0.5 M. The solution was centrifuged and the insoluble matter discarded. This dilution-precipitation procedure was repeated again: the protein was precipitated by dilution with 0.02 M histidine buffer solution (pH 6.4) and left in the refrigerator for one or two hours. The final preparation in 0.5 M KCl was stored at 0° C. It was yellowish white and very turbid. It had a much lower viscosity than that of myosin B from rabbit skeletal muscle.

In this paper, "plasmodial myosin B" is the name given to the preparation from the plasmodium because of the similarity in its preparation and properties to myosin B from rabbit skeletal muscle.

Measurement of Viscosity. The viscosity was measured in Ostwald type viscosimeter, immersed in a water bath at 15° C. The sample and reagents were all in 0.5 M KCl (0.05 M histidine buffer, pH 6.6). In each experiment, 2.4 ml. of the protein solution (about 4 mg./ml.) were used. The outflow time of this solution was adjusted to about 50 sec. with 0.5 M KCl-0.05 M histidine buffer (pH 6.6). The outflow time of the solvent was 31.7 sec. The volume of reagents added was 0.1 ml. Results are expressed in terms of relative viscosity which is the ratio of the outflow time of the solution to that of the solvent.

Superprecipitation. Superprecipitation was observed in a small test tube at 19° C. and at pH 6.6 (in 0.05 M histidine buffer).

Measurement of Enzymatic Activity. The enzymatic activity (ATPase) was assayed by measurement of the orthophosphate liberated from ATP according to the method of Fiske and Subbarow (1925). The reaction system (total volume, 3.0 ml.) consisted of 1.0 ml. of 0.15 M histidine buffer (pH 6.6), 0.5 ml. of CaCl₂, 0.5 ml. of ATP (approximately 2 μ moles), 0.5 ml. of KCl or H₂O and 0.5 ml. of enzyme solution containing 0.08-0.14 mg. of N. All experiments were carried out at 28° C. Under the conditions described above, the rate of the reaction was proportional to the amount of enzyme added. Two or three values were

³ Sometimes no visible precipitate was obtained. The reason for this is uncertain.

determined at different incubation times in most experiments and the rate of dephosphorylation in the linear phase was selected for presentation.

The mixed solution without substrate was preincubated for 5 minutes at 28° C. before adding the substrate. The reaction was stopped by adding 1.0 ml. of 20 per cent trichloroacetic acid. The precipitated protein was removed by centrifugation and the liberated orthophosphate was assayed in 2.0 ml. or 3.0 ml. of the supernatant.

For studying of the time course of hydrolysis, the volume of the reaction mixture was made several times greater than that described above and the aliquots of the solution were withdrawn at intervals for analysis. This procedure was also used to examine the period over which there was constant reaction velocity.

Determination of N. The nitrogen content was determined by the Kjeldahl method. A factor of 6 was used for calculating the protein concentration.

Reagents. ATP⁴ was prepared as a Ba salt from rabbit muscle. This salt was dissolved with 1 N HCl and water. The Ba was precipitated by addition of K₂SO₄ and the solution was neutralized with KOH. The purity of ATP was 88 per cent in terms of easily hydrolyzable phosphate (1 N HCl, 100° C., 10 minutes). Commercial ATP was also used (Ba salt: Wakō, Pure Chemical Industries, Ltd., Japan; Na salt: Zellstoffabrik Waldhof, Germany). AMP was the product of General Biochemicals, Inc., U.S.A. Other substances were of the reagent grade.

Buffer. Histidine-HCl-KOH was used as the buffer solution. KCl was added to this buffer so that the final concentration of K⁺ was the same as that of histidine.

The concentration of K⁺ represented in the present paper means the total amount of K which was derived from various substances in the reaction mixture such as KCl, histidine buffer, K-ATP etc.

The water used had been deionized in an ion-exchanger column.

Results

The physico-chemical properties such as viscosity changes, super-precipitation formation, and the enzymatic character of the contractile protein of *Physarum plasmodium* are described.

I. Changes in Viscosity

Viscosity measurement was used to detect changes in the physical state of the protein solution from the plasmodium. To see whether the ATP-sensitive protein can be extracted with Weber-Edsall solution, or, whether it is soluble in the KCl in Weber-Edsall solution, preliminary experiments were done in both a crude preparation obtained by extraction with Weber-Edsall solution and with KCl-free Weber-Edsall solution, i.e., a solution of 0.01 M Na₂CO₃ + 0.04 M NaHCO₃. The homogenate of the plasmodia was extracted with about one volume of either solution, for 5 hours in a refrigerator. The supernatant fluid separated by centrifugation was used in the incubation. The results were expressed in terms of relative viscosity, which is the ratio of the outflow time of the solution to that of pure water.

⁴ Supplied and analyzed by Dr. K. Nozu of Osaka University through his courtesy.

Fig. 1 a shows results of an experiment in which ATP was added to a crude preparation extracted with Weber-Edsall solution. The viscosity of the extract decreased rapidly on addition of ATP. This decrease was followed by an increase in viscosity to above the initial level. The decrease in viscosity was not to be attributed to dilution of the extract, since addition of Weber-Edsall solution alone had an insignificant effect on viscosity as compared with that of ATP.

On the other hand, a crude preparation extracted with KCl-free Weber-Edsall solution shows no observable change in viscosity on addition of ATP (Fig. 1 b).

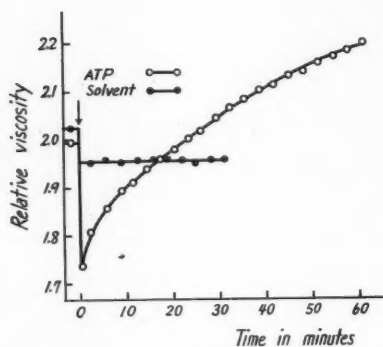


Fig. 1 a.

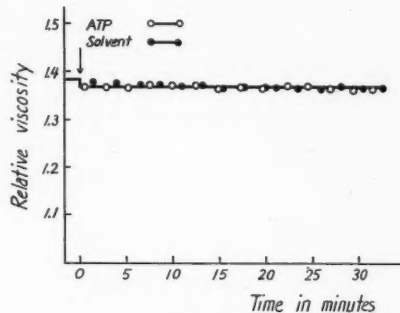


Fig. 1 b.

Fig. 1 a. Effect of ATP on the viscosity of a crude preparation extracted with Weber-Edsall solution. 15°C . ATP, $1.11 \times 10^{-3}\text{M}$.

Fig. 1 b. Effect of ATP on the viscosity of a crude preparation extracted with KCl-free Weber-Edsall solution. 15°C . ATP, $1.11 \times 10^{-3}\text{M}$.

Therefore the factor in the crude extract which responds to ATP is soluble in the KCl in Weber-Edsall solution. Accordingly, the dilution-precipitation procedure was used to isolate this substance. The results obtained with the fraction purified by this procedure will be shown below.

a) Effect of ATP. The effect of ATP on the viscosity of the purified protein solution (plasmodial myosin B) is shown in Figs. 2 and 3. When ATP is added, the viscosity drops rapidly at first. The viscosity then slowly increases to the original level. The process can be repeated (cf. Fig. 5). Ts'o et al. (1956 a, b) also observed a reversible change in viscosity of a protein solution prepared by salt-fractionation on addition of ATP. The results thus obtained exhibit a striking parallelism with a characteristic change in viscosity of rabbit myosin B solution under the influence of ATP (Mommerts 1948).

Fig. 2 shows results of parallel experiments on viscosity change and hydrolysis of ATP added to the protein solution. The increase of viscosity begins after the ATP concentration has diminished to some extent through the enzymatic action (ATPase) of the protein. Fig. 3 represents the relation

of the concentration of ATP to the change in viscosity. The lower the ATP concentration, the shorter is the duration of the lowered viscosity and the faster is the recovery of viscosity. Thus the recovery process may be associated with hydrolysis of ATP, as postulated in muscle myosin B. Csapo (1949) referred to the period in which the viscosity remains constant as the "splitting time."

The viscosity drop brought about in response to ATP is a characteristic feature of muscle myosin B and the degree of change in viscosity can be expressed in terms of ATP sensitivity which is represented by the following formula (Portzehl et al. 1950).

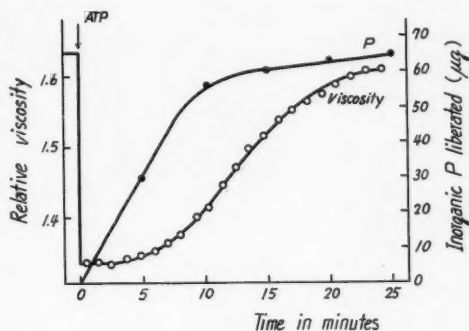


Fig. 2.

Fig. 2. The relationship between the viscosity change of the purified protein and the release of inorganic phosphate. pH 6.6, 15° C. K⁺, 0.55 M; ATP, 0.75×10^{-3} M; plasmodial myosin B, 4 mg./ml.

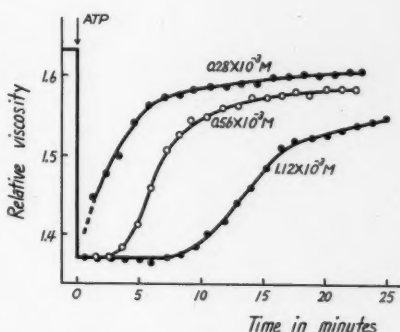


Fig. 3.

Fig. 3. Effect of ATP on the viscosity of plasmodial myosin B. pH 6.6, 15° C. K⁺, 0.55 M. The final concentrations of ATP are indicated in the figure.

$$\text{ATP sensitivity} = \frac{Z_{\eta} - Z_{\eta-\text{ATP}}}{Z_{\eta-\text{ATP}}} \times 100,$$

where $Z_{\eta} = \frac{\ln \eta_{\text{rel}}}{C}$ and $Z_{\eta-\text{ATP}} = \frac{\ln \eta_{\text{rel-ATP}}}{C_{\text{ATP}}}$. C and C_{ATP} are the con-

centration of protein (gm./l.) before and after addition of a sufficient amount of ATP respectively; similarly, η_{rel} and $\eta_{\text{rel-ATP}}$ are the relative viscosities before and after addition of ATP.

From Fig. 2 it is inferred that the ATP sensitivity of plasmodial myosin B solution is 60 per cent (usually 40–60%) and Z_{η} is 0.13. These values are much smaller than for myosin B from skeletal muscle, where the values for ATP sensitivity and Z_{η} are 100–150 per cent and about 0.3 respectively (Portzehl et al. 1950), but are very similar to myosin B from smooth muscle, where values of around 50% for ATP sensitivity and around 0.1 for Z_{η} are given (Needham et al. 1956, Tonomura et al. 1957c). In addition, Tonomura et al. (1955) reported that the ATP

sensitivity of myosin B from the fast-striated adductor of pecten is 200% which is a value much greater than that for myosin B from the slow smooth adductor of pecten (70%).

Thus as far as ATP sensitivity of the drop in viscosity and the viscosity number ($Z\eta$) of the protein solution are concerned, the protein of the *Physarum* plasmodium is more like smooth than skeletal muscle.

b) Effect of adenosinemonophosphate (AMP). Fig. 4 shows that the viscosity of plasmodial myosin B solution is not affected by AMP at a final concentration of 10^{-3} M. The small drop in viscosity may be due to dilution (cf. Fig. 6 b). This result is unlike that for a crude extract

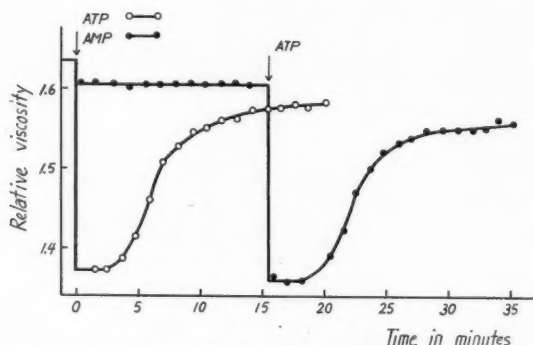


Fig. 4. Effect of AMP on the viscosity of plasmodial myosin B. pH 6.6, 15° C. K^{+} , 0.55 M; ATP, 0.56×10^{-3} M; AMP, 10^{-3} M. The data on the effect of ATP represents one of the curves in Fig. 5.

from myxomycete plasmodium (Loewy 1952, Ts'o et al. 1956 a), but like that of rabbit myosin B (Mommaerts 1948). When ATP is added to a protein solution already treated with AMP, the typical viscosity change is still produced. Thus it is reasonable to conclude that the pyrophosphate group of ATP participates in the change of viscosity. This effect of pyrophosphate is shown below.

c) Effect of inorganic pyrophosphate. It has been reported that the viscosity (Mommaerts 1948) and the light scattering intensity (Tonomura et al. 1953, 1957 b) of a muscle myosin B solution decreased on addition of pyrophosphate, especially in the presence of $MgCl_2$. The decrease in light scattering by pyrophosphate was also enhanced by $CaCl_2$.

In the presence of inorganic pyrophosphate (final concentration, 10^{-3} M) the viscosity of plasmodial myosin B solution gradually decreased to less than that with 0.56×10^{-3} M ATP (Fig. 5). As shown in Fig. 5, this effect is conspicuously enhanced by the subsequent addition of $MgCl_2$ at a final concentration of 10^{-2} M. If pyrophosphate is added to a protein solution containing $MgCl_2$, a considerable viscosity drop takes place: the viscosity falls to the same level as that obtained by adding $MgCl_2$ to a mixture of protein and pyrophosphate. Thus it is immaterial whether the $MgCl_2$ or

pyrophosphate is added first. Since pyrophosphate is not decomposed by this protein (cf. III c) the viscosity is not regained. $MgCl_2$ alone has no effect on viscosity other than a small drop due to dilution.

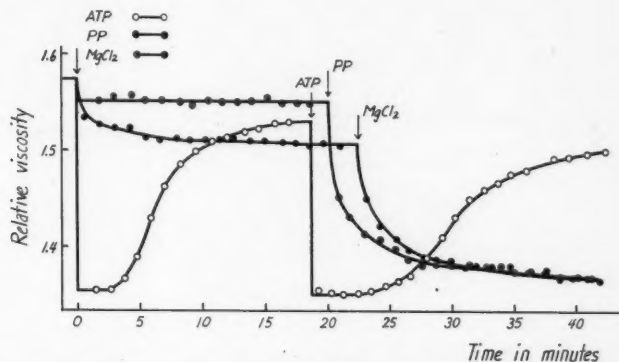


Fig. 5. Effect of inorganic pyrophosphate on the viscosity of plasmodial myosin B in the presence of $MgCl_2$. pH 6.6, $15^\circ C$. K^+ , 0.55 M; ATP, 0.56×10^{-3} M; pyrophosphate (PP), 10^{-3} M; $MgCl_2$, 10^{-3} M.

When $CaCl_2$ (final concentration, 10^{-2} M) is added to a protein solution with a low viscosity due to pyrophosphate, its effect is contrary to that of

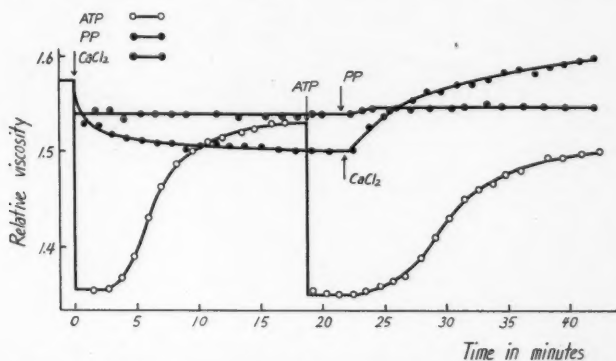


Fig. 6 a. Effect of inorganic pyrophosphate on the viscosity of plasmodial myosin B in the presence of $CaCl_2$. pH 6.6, $15^\circ C$. K^+ , 0.55 M; ATP, 0.56×10^{-3} M; pyrophosphate (PP), 10^{-3} M; $CaCl_2$, 10^{-2} M. Results on the effect of ATP are those shown in Fig. 5.

$MgCl_2$ (Figs. 6 a, b). That is, the reduced viscosity is completely restored to the initial or even higher level. On the other hand, when pyrophosphate is added in the presence of $CaCl_2$, a small increase in viscosity is observed. In one experiment, it caused no change (Fig. 6 b).

d) Effect of CaCl_2 and MgCl_2 in the presence of ATP. As mentioned before, recovery of viscosity may be closely connected with hydrolysis of ATP. To investigate this, the effects of CaCl_2 and MgCl_2 were

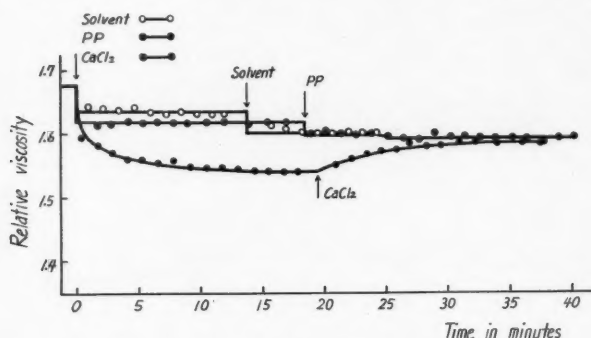


Fig. 6b. The same as in Fig. 6a. pH 6.6, 15°C . K^+ , 0.55 M ; pyrophosphate (PP), 10^{-3} M ; CaCl_2 , 10^{-2} M . The solvent indicated in the figure is 0.5 M KCl (0.05 M histidine buffer, pH 6.6).

studied, for the ATPase activity of plasmodial myosin B is stimulated by CaCl_2 and inhibited by MgCl_2 at a high K^+ concentration (cf. III e).

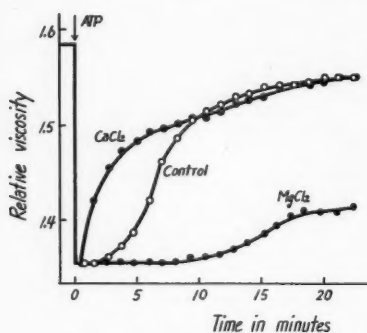


Fig. 7.

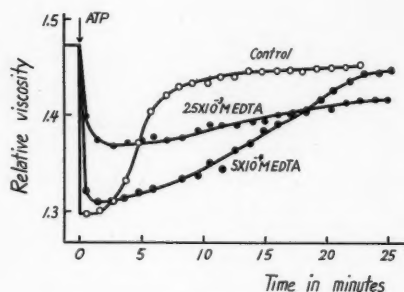


Fig. 8.

Fig. 7. Effect of CaCl_2 and MgCl_2 on the viscosity of plasmodial myosin B. pH 6.6, 15°C . K^+ , 0.55 M ; ATP, $0.56 \times 10^{-3}\text{ M}$; CaCl_2 , 10^{-2} M ; MgCl_2 , 10^{-2} M .

Fig. 8. Effect of EDTA on the viscosity of plasmodial myosin B. pH 6.6, 15°C . K^+ , 0.55 M ; ATP, $0.56 \times 10^{-3}\text{ M}$. The final concentrations of EDTA are indicated in the figure.

Fig. 7 shows the results seen when CaCl_2 and MgCl_2 (final concentration, 10^{-2} M) are added to a protein solution simultaneously with ATP. The duration of the lowering of the viscosity, i.e., the "splitting time," is

shortened by CaCl_2 , whereas it is considerably lengthened by MgCl_2 . The effect of MgCl_2 may be due, in part, to stimulation of adenylate kinase (Bowen and Kerwin 1954 c), which may be present in this protein fraction (cf. III a). The viscosity drop caused by ATP is not affected by these cations, as shown in Fig. 7. In some cases, however, CaCl_2 exerts a somewhat inhibitory effect on the viscosity drop, but the exact determination of this was impossible for technical reasons (viscosimetry).

e) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). In the experiments described above metal cations such as Ca^{++} or Mg^{++} were added externally together with ATP. If a metal bound to the protein structure is removed, what happens in the viscosity change induced by ATP? To investigate this, EDTA, a strong chelating agent of multivalent metal cations, was tested.

It has been reported by Friess (1954 a, b) and by Tonomura et al. (1955, 1957 a) that EDTA inhibits the drop in viscosity and intensity of light scattering of muscle myosin B solution after the addition of ATP.

As shown in Fig. 8, the viscosity of plasmodial myosin B solution is affected in a characteristic way by addition of EDTA at the final concentrations shown in the figure. If ATP is added to the protein solution together with EDTA, the viscosity drop becomes less than without EDTA. Thus EDTA inhibits the fall of viscosity caused by ATP. On the other hand, the recovery of viscosity is conspicuously inhibited by EDTA. Therefore a metal bound to the protein structure is essential to the viscosity change induced by ATP. A lengthening of the "splitting time" may be due to inhibition of ATPase activity (cf. III j).

II. Solubility and Superprecipitation

The solubility of the contractile protein from the plasmodium like that of muscle myosin B varies with the K^+ concentration. That is, this protein precipitates at a low concentration of K^+ (e. g., 0.1 M), while it is soluble when the K^+ concentration is high (e. g., 0.5 M).

If ATP is added to a suspension of the protein, the voluminous precipitate gradually settles to the bottom of the test tube and its volume decreases (Fig. 9). This phenomenon is called superprecipitation and is a distinct character of muscle myosin B (Szent-Györgyi 1951 a). However, superprecipitation of plasmodial myosin B proceeds much more slowly than that of skeletal muscle myosin B.

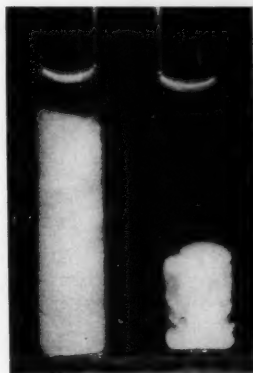


Fig. 9. Superprecipitation of plasmodial myosin B by addition of ATP. pH 6.6 (0.03 M histidine buffer), 19° C. K^+ , 0.11 M; ATP, 0.47×10^{-3} M; plasmodial myosin B, 1.31 mg./ml. Left: control. Right: ATP-treatment.

Photographed 70 min. after addition.

III. Enzymatic properties

It is accepted that muscle myosin B is an enzyme which generally hydrolyzes only terminal phosphate bond of ATP. The present section is on the enzymatic properties of the protein from the plasmodium. As described above, plasmodial myosin B either shows viscosity changes or superprecipitation when ATP is added. Which of these changes takes place depends on the K^+ concentration. Therefore the enzymatic properties were studied in varying concentrations of K^+ .

a) General features. The hydrolysis of ATP in the presence of a high concentration of K^+ (0.48 M) is shown in Figs. 10 a and b. Fig. 10 a shows the time course of hydrolysis of ATP with various concentrations of

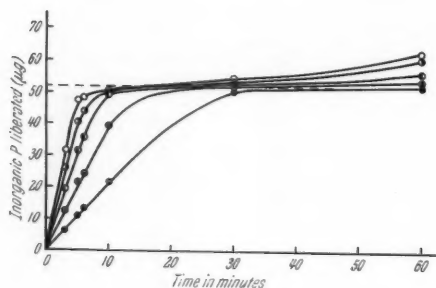


Fig. 10 a.

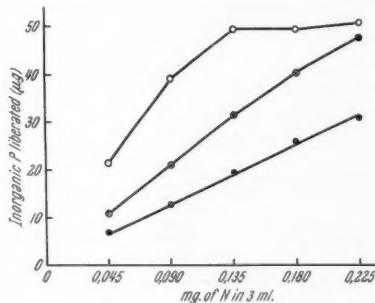


Fig. 10 b.

Fig. 10 a. Hydrolysis of ATP by various amounts of plasmodial myosin B at a high K^+ concentration. pH 6.6, 28°C . K^+ , 0.48 M; ATP, 0.56×10^{-3} M; CaCl_2 , 10^{-2} M; plasmodial myosin B (mg. of N), \bullet , 0.045; \circ , 0.09; \bullet , 0.135; \bullet , 0.180; \circ , 0.225. The broken line indicates the level corresponding to half the easily hydrolyzable phosphate of ATP.

Fig. 10 b. The relationship between the hydrolysis of ATP and the concentration of plasmodial myosin B. Reaction time, \bullet , 3 min.; \circ , 5 min.; \circ , 10 min.

enzyme in the presence of CaCl_2 at a final concentration of 10^{-2} M. When either the concentration of enzyme is low or the incubation period short, hydrolysis of ATP almost ceases when about half the easily hydrolyzable phosphate of ATP has been split. This means that myosin B from plasmodium possesses ATPase activity. When the incubation period is longer with more enzyme, however, more than half the labile phosphate of ATP is split. Thus this protein fraction may contain adenylate kinase catalyzing the dismutation of two molecules of adenosinediphosphate (ADP) to ATP and AMP.

Fig. 10 b, which is derived from Fig. 10 a, represents the relation of the hydrolysis of ATP to the concentration of enzyme. Fig. 10 a and b show that the rate of dephosphorylation remains constant for a period of 5 minutes at between 0.045 and 0.14 mg. N of enzyme and is proportional to the amount of enzyme during this time.

Similar experiments were made at a low K^+ concentration (0.1 M). The results are shown in Figs. 11 a and b. Unlike results at a high concentration of K^+ , more than half the labile phosphate of ATP was progressively split. This may be because the adenylate kinase activity is much higher at a low concentration of KCl (cf. Bowen and Kerwin 1954 c). Fig. 11 a and b show that the rate of the reaction remains constant in a 15 minutes' reaction period at between 0.045 and 0.14 mg. N of enzyme and is proportional to the amount of enzyme during this period.

The specific activities (from 3 data) are 1.68 and 0.52 μ moles of P/mg. of N/min. at K^+ concentrations of 0.5 M and 0.1 M respectively (in the presence of 10^{-2} M $CaCl_2$, 28° C, pH 6.5, 0.65×10^{-3} M ATP). It is reported that the

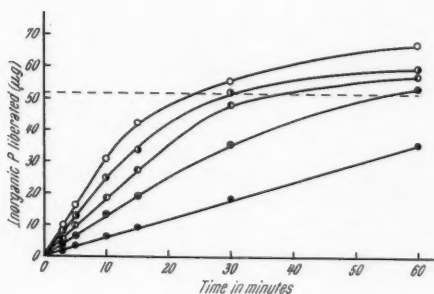


Fig. 11 a.

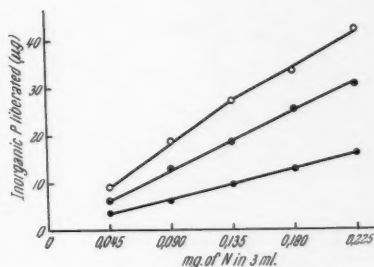


Fig. 11 b.

Fig. 11 a. Hydrolysis of ATP by various amounts of plasmodial myosin B at a low K^+ concentration. The conditions are the same as in Fig. 10 a, except that the K^+ concentration is 0.1 M. The broken line indicates the level corresponding to half the easily hydrolyzable phosphate of ATP.

Fig. 11 b. The relationship between the hydrolysis of ATP and the concentration of plasmodial myosin B. Reaction time, ●, 5 min.; ○, 10 min.; ○, 15 min.

ATPase activity of skeletal muscle myosin B measured in the presence of 10^{-2} M $CaCl_2$ (28° C., pH 7.0) is about 3.0 and 6.0 μ moles of P/mg. of N/min. at 0.6 and 0.1 M KCl respectively and the corresponding values for smooth muscle myosin B of the uterus are about 0.6 and 0.2 (Needham and Cawwell 1956, 1958). Thus it follows that the ATPase activity of plasmodial myosin B is smaller than that of skeletal muscle but higher than that of smooth muscle.

b) Hydrolysis of ATP. Figs. 12 a and b show the time course for the hydrolysis of ATP in the presence and absence of $CaCl_2$ and $MgCl_2$ both at a final concentration of 3.3×10^{-3} M. Fig. 12 a shows results at a high K^+ concentration (0.5 M). ATPase activity is conspicuously enhanced by $CaCl_2$, while it is inhibited by $MgCl_2$. The activity of the control without the bivalent cations is here 0.21 μ moles of P/mg. of N/min. This activity is increased about 7 fold by $CaCl_2$, i. e., increased to 1.44 μ moles of P/mg. of

N/min., whereas it is decreased about 50%⁵ by $MgCl_2$, *i. e.*, the residual activity is 0.15 μ moles of P/mg. of N/min.

If $MgCl_2$ is present in the reaction mixture, however, dephosphorylation of ATP tends to proceed beyond a level corresponding to half the easily hydrolyzable phosphate during longer incubation periods. This is so too with a low K^+ concentration, as shown in Fig. 12 *b*. This may be due to the adenylate kinase activity which is accelerated by $MgCl_2$ (Bowen and Kerwin 1954 *c*).

Fig. 12 *b* shows results on the ATPase activity in the presence of a low K^+ concentration (0.1 M). The ATPase activity is stimulated about 3.5 fold by $CaCl_2$, *i. e.*, from 0.14 to 0.5 μ moles of P/mg. of N/min. On the other

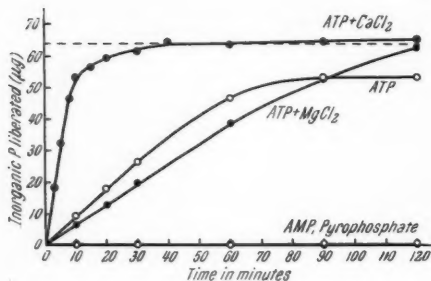


Fig. 12 *a*.

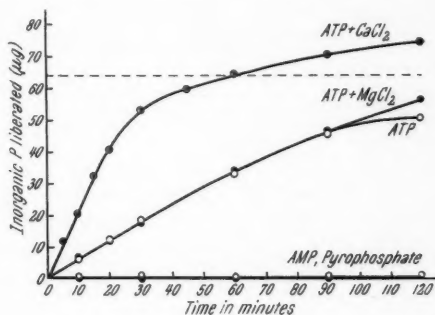


Fig. 12 *b*.

Fig. 12 *a*. Time curves for hydrolysis of ATP, AMP and inorganic pyrophosphate at a high K^+ concentration. pH 6.6, 28° C. K^+ 0.5 M; ATP, 0.69×10^{-3} M; AMP, 0.85×10^{-3} M; pyrophosphate, 0.85×10^{-3} M; $CaCl_2$, 3.5×10^{-3} M; $MgCl_2$, 3.5×10^{-3} M; plasmodial myosin B, 0.141 mg. of N. The broken line indicates the level corresponding to half the easily hydrolyzable phosphate of ATP.

Fig. 12 *b*. Time curves for hydrolysis of ATP, AMP and inorganic pyrophosphate at a low K^+ concentration. The conditions are the same as in Fig. 12 *a*, except that the K^+ concentration is 0.1 M. The broken line indicates the level corresponding to half the easily hydrolyzable phosphate of ATP.

hand, $MgCl_2$ has no effect on the hydrolysis of ATP, *i. e.*, the activity remains at 0.14 μ moles of P/mg. of N/min.

We can see from these figures that the ATPase activity at a high K^+ concentration is stronger than that at a low one in the absence of bivalent cations or in the presence of $CaCl_2$, whereas if $MgCl_2$ is present, there is no appreciable difference with a high or low K^+ concentration. More results on the effect of the K^+ concentration will be shown later.

c) Hydrolysis of AMP and inorganic pyrophosphate. Figs. 12 *a* and *b* also show experiments with AMP and inorganic pyrophosphate as substrates (final concentration, AMP: 0.85×10^{-3} M, pyrophos-

⁵ More inhibition (50–60% of the control) was also observed (*cf.* Table I and Fig. 13 *a*).

phate: 0.85×10^{-3} M). Myosin B of the plasmodium has no measurable activity towards AMP or inorganic pyrophosphate at either a high or low K^+ concentration.

d) Effect of K^+ ion concentration. It is well known that the ATPase activity of myosin B from rabbit skeletal muscle is stimulated by KCl and this stimulation is affected by $CaCl_2$ or $MgCl_2$ (Mommaerts and Seraidarian 1947, Szent-Györgyi 1951a, Hasselbach 1952, Needham 1952, Tonomura et al. 1953, Watanabe et al. 1953, Bowen and Gershfeld 1957, etc.).

Table 1 summarizes the effect of the K^+ concentration on the ATPase activity of plasmodial myosin B with and without $CaCl_2$ and $MgCl_2$ at a

Table 1. Effect of K^+ Concentration on ATPase activity with or without $CaCl_2$ and $MgCl_2$. pH 6.6, $28^\circ C$. ATP, 0.74×10^{-3} M; $CaCl_2$, 3.3×10^{-3} M; $MgCl_2$, 3.3×10^{-3} M; plasmodial myosin B, 0.101 mg. of N.

Molar concentration of K^+	μ moles of P/mg. of N/min.		
	None	$CaCl_2$	$MgCl_2$
0.08	0.11	0.24	0.15
0.15	0.21	0.76	0.18
0.30	0.23	1.46	0.14
0.45	0.25	1.46	0.12
0.60	0.25	1.34	0.10
0.80	0.24	1.34	0.09

final concentration of 3.3×10^{-3} M in each case. Plasmodial myosin B hydrolyzes ATP maximally at about 0.5 M K^+ when no bivalent cation is added to the reaction mixture. Addition of $CaCl_2$, however, increases enzymatic activity at all concentrations of K^+ so far investigated (0.08 M–0.8 M). In the presence of $CaCl_2$, the ATPase activity becomes progressively greater as the K^+ concentration increases and is maximal at about 0.4 M K^+ . It is reported that in the presence of $CaCl_2$, the ATPase activity of skeletal muscle myosin B decreases with increasing KCl concentrations (maximal activity, at or below 0.1 M KCl, Mommaerts and Seraidarian 1947, Watanabe et al. 1953, Bowen and Gershfeld 1957, etc.), while the activity of smooth muscle myosin B increases with increasing KCl concentrations (maximal activity, at about 0.6 M KCl, Needham and Cawkwell 1956). Therefore the myosin B ATPase of plasmodium is affected by the K^+ concentration like that of smooth muscle rather than that of skeletal muscle.

When $MgCl_2$ is present in the reaction mixture, the ATPase activity is modified by the K^+ concentration. Table 1 shows that at a K^+ concentration of less than 0.1 M, i. e., at 0.08 M, the rate of hydrolysis of ATP is stimulated. This stimulation is shown more clearly in Fig. 13b. The stimulation by $MgCl_2$, however, is diminished and there is inhibition of ATPase activity when the K^+ concentration is increased to above 0.15 M. The fact that the enzymatic activity is accelerated by $MgCl_2$ at a low K^+ concentration, while

it is inhibited by it at a high concentration coincides with one of the remarkable features of the ATPase of skeletal muscle myosin B (or actomyosin). The table shows that the ATPase activity is maximal at about 0.15 M K^+ in the presence of $MgCl_2$.

e) Effect of Ca and Mg ion concentrations. The experiments conducted at a high concentration of K^+ (0.51 M) are represented in Fig. 13 a. In the concentration range studied ($CaCl_2$: 1.7×10^{-1} M– 10^{-4} M,

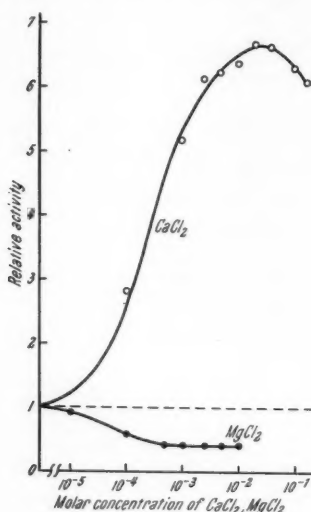


Fig. 13 a.

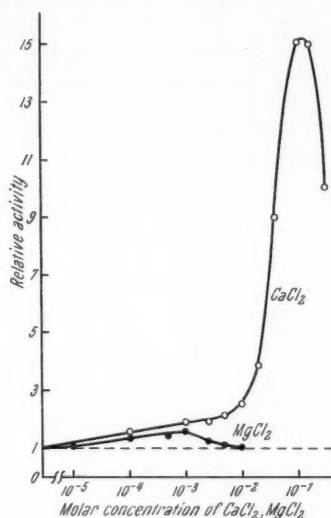


Fig. 13 b.

Fig. 13 a. Effect of $CaCl_2$ and $MgCl_2$ on the hydrolysis of ATP by plasmodial myosin B at a high K^+ concentration. pH 6.6, 28° C. K^+ , 0.51 M; ATP, 0.72×10^{-3} M; plasmodial myosin B, 0.117 mg. of N.

Fig. 13 b. Effect of $CaCl_2$ and $MgCl_2$ on the hydrolysis of ATP by plasmodial myosin B at a low K^+ concentration. The conditions are the same as in Fig. 13 a, except that the K^+ concentration is 0.08 M.

$MgCl_2$: 10^{-2} M– 10^{-5} M) $CaCl_2$ always increases the ATPase activity, while $MgCl_2$ inhibits it. The activating effect of $CaCl_2$ is maximal at a concentration of $2-4 \times 10^{-2}$ M, being then about 6.6 times greater than that in the absence of $CaCl_2$. Inhibition by $MgCl_2$ becomes greater with increase in $MgCl_2$ concentration. However, there is still about 40% residual activity even at or above 10^{-3} M.

From the data shown in Fig. 13 a, the dissociation constants of the Ca-enzyme complex (K_{Ca}) and the Mg-enzyme complex (K_{Mg}) are to be calculated (cf. Watanabe et al. 1953); they are about 0.3×10^{-3} M and 0.5×10^{-4} M respectively.

Fig. 13 b represents the result of experiments with a low concentration of K^+ (0.08 M). $CaCl_2$ again activates the enzyme at all concentrations in-

vestigated. Stimulation by CaCl_2 , however, increases gradually up to 10^{-2} M, and then abruptly increases and reaches a maximum at between 10^{-1} and 1.7×10^{-1} M CaCl_2 . At 10^{-1} M, the ATPase activity is about 15 times that of the control.

As mentioned before, the ATPase activity is stimulated by MgCl_2 with less than 0.1 M K^+ . This was so over a wide range of MgCl_2 concentrations. Fig. 13 b shows that the optimal concentration of MgCl_2 is 10^{-3} M, at which concentration the activity is about 150% of the control.

The maximal activities in the presence of CaCl_2 , as shown in Figs. 13 a

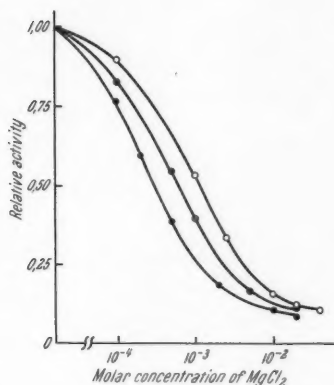


Fig. 14 a.

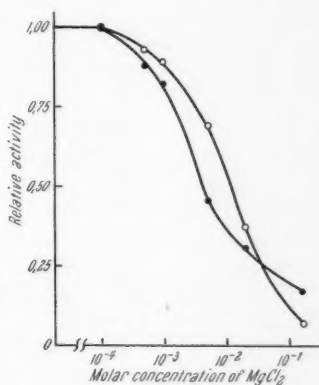


Fig. 14 b.

Fig. 14 a. Antagonism between Ca and Mg ions at a high K^+ concentration. pH 6.6, 28°C . K^+ , 0.5 M; ATP, 0.74×10^{-3} M; CaCl_2 , \circ , 10^{-2} M; \odot , 5×10^{-3} M; \bullet , 2×10^{-3} M; plasmodial myosin B, 0.13 mg. of N.

Fig. 14 b. Antagonism between Ca and Mg ions at a low K^+ concentration. pH 6.6, 28°C . K^+ , 0.08 M; ATP, 0.67×10^{-3} M; CaCl_2 , \circ , 10^{-1} M; \bullet , 4×10^{-2} M; plasmodial myosin B, 0.089 mg. of N.

and b, are 1.71 (at 2×10^{-2} M CaCl_2) and 1.84 (at 10^{-1} M CaCl_2) μmoles of P/mg. N/min. (pH 6.6, 28°C .) at K^+ concentrations of 0.51 M and 0.08 M respectively. Therefore the maximal activity of the ATPase is almost the same whether the K^+ concentration is high or low.

f) Antagonism between Ca and Mg ions. The stimulation of ATPase by CaCl_2 is strongly inhibited by MgCl_2 at both high and low K^+ concentrations (Figs. 14 a, b). This inhibition demonstrates a strong antagonism between Ca^{++} and Mg^{++} . This has also been reported in muscle myosin B (Mommaerts and Seraidarian 1947, Tonomura et al. 1953, Watanabe et al. 1953, Bowen and Gershfeld 1957, etc.).

g) Effect of pH. The pH of the reaction mixture was varied between 5.0 and 9.4 with histidine buffer at a final concentration of 0.033 M.

According to Mommaerts and Seraidarian (1947) and Mommaerts and Green (1954), myosin B ATPase from skeletal muscle has

a true optimum at pH 6.5 and an apparent optimum at pH 9.0 or higher in the presence of CaCl_2 . In general, the former optimum is much weaker than that of the latter.

The pH-activity curve for myosin B ATPase from plasmodium in the presence of CaCl_2 (final concentration, 10^{-2} M) is shown in Figs. 15 a and b. At a high K^+ concentration (0.5 M), a weak optimum is observed at about pH 6.2. The activity, however, abruptly falls on the acid side and there is hardly any activity at pH 5.0. There is considerable activation above pH 7.0. When the K^+ concentration is low (0.1 M), a sharp acid optimum is found at about pH 5.4. On the alkaline side, the activity increases with pH.

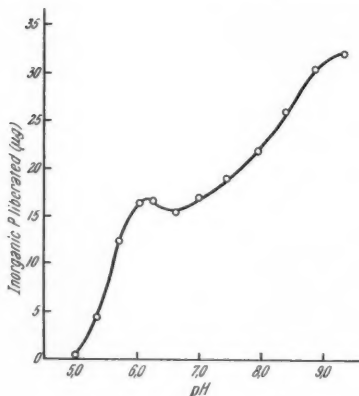


Fig. 15 b.

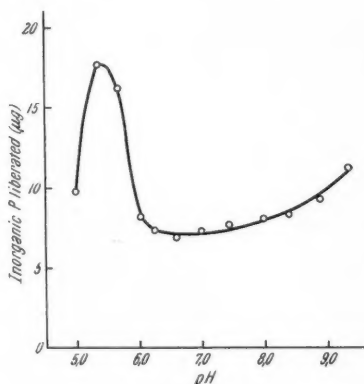


Fig. 15 a.

Fig. 15 a. Effect of pH on the ATPase activity of plasmodial myosin B at a high K^+ concentration. 28°C . K^+ , 0.5 M; ATP, 0.71×10^{-3} M; CaCl_2 , 10^{-2} M; plasmodial myosin B, 0.098 mg. of N. Reaction time, 5 min.

Fig. 15 b. Effect of pH on the ATPase activity of plasmodial myosin B at a low K^+ concentration. The conditions are the same as in Fig. 15 a, except that the K^+ concentration is 0.1 M and the reaction time is 6 min.

h) Effect of 2,4-dinitrophenol (DNP). Greville and Needham (1955), Chappell and Perry (1955) and Greville (1956) reported that the ATPase activity of myosin from rabbit skeletal muscle is stimulated by DNP at all ionic strengths, while the activity of myosin B is accelerated by it only at high ionic strengths. Chappell and Perry also demonstrated that the activation of myosin ATPase by DNP at low ionic strengths diminished progressively as actin is added to the myosin.

Fig. 16 represents results with various concentrations of DNP. The ATPase activity of plasmodial myosin B is stimulated by DNP in the presence of CaCl_2 (10^{-2} M) at both low and high K^+ concentrations. The effect of DNP, however, is much more in the former case. Thus, when the K^+ concentration is low (0.08 M), the ATPase activity increases with increase in DNP concentration. At 5×10^{-3} M DNP, the activity is about 140% of

the control. On the contrary, when the K^+ concentration is high (0.48 M), the enzymatic activity is maximal with about 10^{-3} M DNP (110% of the control) but there is hardly any effect at 5×10^{-3} M.

Thus the ATPase of plasmodial myosin B is influenced by DNP like myosin rather than myosin B (or actomyosin) from skeletal muscle.

It is reported that the ATPase activity of uterus myosin B is activated by DNP at both low and high KCl concentrations (Needham and Cawwell 1956). Accordingly, myosin B ATPase from plasmodium resembles smooth muscle (uterus) in behaviour.

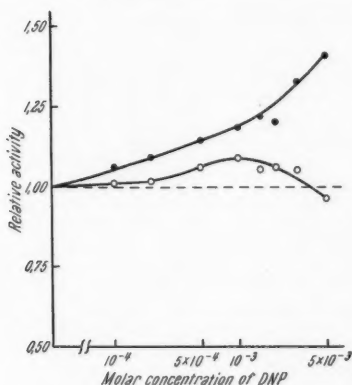


Fig. 16.

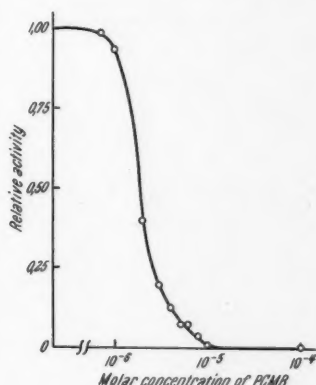


Fig. 17.

Fig. 16. Effect of DNP on the ATPase activity of plasmodial myosin B at high and low K^+ concentrations. pH 6.6, 28° C. K^+ , \circ , 0.48 M; \bullet , 0.08 M; ATP, 0.7×10^{-3} M; $CaCl_2$, 10^{-2} M; plasmodial myosin B, 0.115 mg. of N.

Fig. 17. Effect of PCMB on the ATPase activity of plasmodial myosin B at a high K^+ concentration. pH 6.6, 28° C. K^+ , 0.49 M; ATP, 0.72×10^{-3} M; $CaCl_2$, 10^{-2} M; plasmodial myosin B, 0.108 mg. of N.

i) Effect of SH inhibitors. The effect of *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB) and monoiodoacetic acid (MIA) at various concentrations on the ATPase activity were investigated.

The presence of SH group is essential for the ATPase activity of plasmodial myosin B. Fig. 17 shows the relation of PCMB to the ATPase activity with a high K^+ concentration (0.49 M). $CaCl_2$ at a final concentration of 10^{-2} M was present in the reaction mixture. The inhibitory effect of PCMB is strong, the activity being completely inhibited by about 10^{-5} M PCMB. According to Greville and Needham (1955), phenylmercuric acetate (PMA) accelerates the ATPase activity of muscle myosin B at low concentrations but inhibits it at high concentrations at a high ionic strength. Kielley and Bradley (1956) reported a similar stimulation by PCMB. No such stimulation is seen in this case even with low concentrations of PCMB.

The inhibition caused by PCMB is partially prevented by cysteine, as shown in Table 2. A preparation treated for 5 minutes with 10^{-5} M PCMB, a concentration which caused complete inhibition, was incubated for various

Table 2. *Reactivation of PCMB-inhibited ATPase by cysteine. pH 6.6, 28° C. K^+ , 0.46 M; ATP, 0.67×10^{-3} M; $CaCl_2$, 10^{-2} M; PCMB, 10^{-5} M; cysteine, 2×10^{-4} M; plasmodial myosin B, 0.097 mg. of N. Reaction time, 5 min.*

Incubation time with cysteine (min.)	μ moles of P/mg. of N/min.		Percentage recovery
	no PCMB	PCMB	
0	1.52	0	0
10	1.48	0.15	10.1
20	1.49	0.17	11.4
30	1.49	0.24	16.1
60	1.50	0.28	18.7

Table 3 a. *Effect of MIA on the ATPase activity of plasmodial myosin B at a high K^+ concentration. pH 6.6, 28° C. K^+ , 0.5 M; ATP, 0.68×10^{-3} M; $CaCl_2$, 10^{-2} M; plasmodial myosin B, 0.097 mg. of N.*

Molar concentration of MIA	μ moles of P/mg. of N/min.
0	1.71
10^{-5}	1.71
10^{-4}	1.69
10^{-3}	1.74
10^{-2}	1.71

Table 3 b. *Effect of MIA on the ATPase activity of plasmodial myosin B at a low K^+ concentration. The conditions are the same as in Table 3 a, except that the K^+ concentration is 0.12 M.*

Molar concentration of MIA	μ moles of P/mg. of N/min.
0	0.51
10^{-5}	0.51
10^{-4}	0.51
10^{-3}	0.51
10^{-2}	0.52

periods (10, 20, 30 and 60 minutes) with cysteine. The reaction was then started by the addition of ATP. After 5 minutes' incubation with ATP, the samples were withdrawn for analysis. As a control, a sample was incubated with cysteine but not PCMB. No cysteine was added to the sample at zero time shown in the table. As illustrated in Table 2, the inhibitory effect of PCMB is about 19% reversed one hour after 2×10^{-4} M cysteine

is added. When 10^{-3} M cysteine was added, there was about 30% reversal. PCMB, when added simultaneously with cysteine, had no effect. Therefore this ATPase is an SH enzyme.

The effects of MIA on plasmodial myosin B ATPase are shown in Tables 3 a and b. Activity is not affected by MIA at a high (0.5 M) or low (0.12 M) K^+ concentration. This is in agreement with the results of Needham (1942) but not with those of Polis and Meyerhof (1947) who showed that low concentrations of MIA activated muscle myosin ATPase.

j) Effect of EDTA. The ATPase activity of rabbit myosin B is stimulated by EDTA with high concentrations of KCl, while it is depressed with low concentrations of KCl (Friess 1954 a, b, Bowen and Kerwin 1954 a, b, Friess et al. 1954).

The influence of EDTA on the ATPase activity of plasmodial myosin B is shown in Fig. 18. The EDTA used was the disodium salt, so the concentration of the Na^+ (final, 2×10^{-2} M) was maintained constant by addition of NaCl to the reaction mixture. There was no $CaCl_2$ in the mixture. As shown in this figure, the enzymatic activity is conspicuously inhibited by EDTA (10^{-2} M— 10^{-5} M) both at high and low K^+ concentrations. The inhibitory effect of EDTA, however, is a little more remarkable at a high K^+ concentration.

According to Friess et al. (1954) the stimulation of myosin B ATPase is mediated by a metal on the protein structure. This metal may be Mg^{++} . In a note of Tonomura et al. (1957 a) it is shown that EDTA binds loosely with intrinsic Mg^{++} of protein. As already shown, myosin B ATPase of plasmodium is stimulated by $CaCl_2$ over a wide range of K^+ concentrations. Therefore the inhibitory effect of EDTA on the enzymatic activity may be due to removal or inactivation of Ca^{++} , which may be fixed to the protein structure and be indispensable for the enzymatic activity. In other words, Ca^{++} may be an integral part of a prosthetic group of this enzyme.

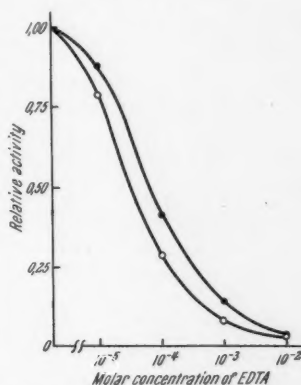


Fig. 18. Effect of EDTA on the ATPase activity of plasmodial myosin B at a high and low K^+ concentrations. pH 6.6, 28° C. $[K^+ + Na^+]$, ○, 0.5 M; ●, 0.1 M; ATP, 0.69×10^{-3} M; plasmodial myosin B, 0.115 mg. of N.

Discussion

The important results obtained in the foregoing experiments may be recapitulated as follows.

1. A protein was obtained from the plasmodium of myxomycete, *Phy-sarum polycephalum*, through extraction with Weber-Edsall solution followed by dilution-precipitation procedure.

2. This protein fraction has ATPase activity which is conspicuously enhanced by CaCl_2 over a wide range of K^+ concentration, but which is inhibited by MgCl_2 at a high concentration of K^+ and stimulated at a low concentration. The ATPase is an SH enzyme.

3. The protein exhibits characteristic changes in viscosity when ATP is added. The drop in viscosity caused by ATP is not inhibited even under the condition where the ATPase activity is depressed by MgCl_2 . Inorganic pyrophosphate, which is not hydrolyzed by this protein, also induces a decrease in viscosity, especially in the presence of MgCl_2 . The recovery of viscosity, on the other hand, is accelerated by an activator of ATPase such as CaCl_2 , while it is delayed by an inhibitor such as MgCl_2 or EDTA. Thus it is inferred that, as with muscle myosin B (M o m m a e r t s 1950), the initial drop in viscosity brought about by ATP is a non-enzymatic process unrelated to the dephosphorylation of ATP, while the recovery process is enzymatic and closely associated with the hydrolysis of ATP.

4. The solubility of this protein depends on the K^+ concentration.

5. If ATP is added to the gel of the protein, it superprecipitates.

These facts indicate that there is in the myxomycete plasmodium a contractile protein (plasmodial myosin B) which has a strong resemblance to that of muscle myosin B (actomyosin) in its physico-chemical and enzymatic properties.

The fact that the ATP sensitivity of this protein solution is small (cf. Szent-Györgyi 1951b, Yagi 1957), and that the ATPase activity is accelerated by DPN at a low K^+ concentration suggests a low actin content of the protein.

However, in plasmodial myosin B, myosin may not necessarily be combined with actin but with another substance, since it is known (Engelhardt 1958, Stekol 1959) that when myosin is treated with dyes (e.g., congo red) or non-depolymerized nucleic acid, the resulting complex behaves also in the same manner as does a complex of myosin and actin (actomyosin).

Apart from this problem it is known that the ATP content of the normal plasmodium is about 4×10^{-4} M (Hatano and Takeuchi 1960), and if ATP is further added externally (Kamiya et al. 1957), or, if ATP is injected into this organism (Takata 1957), the motive force of the streaming is conspicuously augmented. The energy required for the protoplasmic streaming in the plasmodium of *Physarum polycephalum* is reasonably assumed to be supplied by ATP (Kamiya et al. 1957, Kamiya 1959). As the protein in question reacts specifically with ATP *in vitro* we may assume that this protein (plasmodial myosin B) is the active principle which responds to ATP in a characteristic way *in vivo*. From these lines of evidences, it is nearly safe to say that plasmodial myosin B is a substance playing a crucial part in the mechanochemical phenomenon underlying protoplasmic streaming. Just as in the case of the muscle, the fundamental biochemical mechanism causing the protoplasmic streaming in the plasmodium of *Physarum* may be the interaction between myosin B and ATP.

Acknowledgements

I wish to express my thanks to Professor N. Kamiya for his constant encouragement and valuable suggestion throughout this investigation. I am also indebted to Professor S. Akabori, the director of the Institute for Protein Research, for valuable advice.

Summary

I. A contractile protein was extracted from the plasmodium of a myxomycete, *Physarum polycephalum*, with Weber-Edsall solution and purified by the dilution-precipitation procedure.

II. The crude preparation extracted with Weber-Edsall solution shows a remarkable change in viscosity in the presence of ATP, while the crude preparation extracted with KCl-free Weber-Edsall solution does not respond to ATP.

III. The following results were obtained on the viscosity of the purified protein solution:

- (1) The viscosity decreases remarkably on addition of ATP, and then gradually returns to nearly the original level after the ATP content of the solution had diminished through the enzymatic action of the protein. The process can be repeated.
- (2) The ATP sensitivity is 40–60% and the viscosity number is 0.13.
- (3) AMP has no effect on the viscosity.
- (4) Inorganic pyrophosphate causes a decrease in viscosity and its effect is considerably enhanced by $MgCl_2$. Unlike $MgCl_2$, $CaCl_2$ nearly restores the viscosity to the control value after it has been reduced by pyrophosphate.
- (5) $MgCl_2$ or $CaCl_2$ alone hardly causes any change in viscosity.
- (6) When added with ATP, $CaCl_2$ shortens the "splitting time", while $MgCl_2$ lengthens it.
- (7) When added with ATP, EDTA inhibits both the initial drop and subsequent recovery of viscosity.

IV. The protein precipitates at a low K^+ concentration and is soluble at a high concentration.

V. Superprecipitation is observed with this protein.

VI. The following enzymatic properties of the protein were found.

- (1) There is ATPase activity catalyzing hydrolysis of one terminal phosphate bond of ATP, but adenylate kinase may be present.
- (2) AMP and inorganic pyrophosphate are not decomposed either in the presence of high or low K^+ concentration.
- (3) The ATPase activity is stimulated by an appropriate amount of K^+ .
- (4) $CaCl_2$ accelerates ATPase activity over a wide range of K^+ concentrations, but $MgCl_2$ accelerates it at a low concentration of K^+ and inhibits it at a high concentration.
- (5) There is antagonism between Ca^{++} and Mg^{++} both at high and low K^+ concentrations.

- (6) pH optima are at about 5.4 and 6.2 in the presence of low and high K^+ concentrations respectively. On the alkaline side, the activity increases with the pH.
- (7) DNP accelerates ATPase activity at both high and low K^+ concentrations.
- (8) PCMB inhibits ATPase activity. This inhibition is partially reversed by cysteine.
- (9) MIA has no effect on ATPase activity at either high or low K^+ concentration.
- (10) EDTA inhibits the enzyme either with high and low concentrations of K^+ .

VII. The contractile protein of the plasmodium has physico-chemical and enzymatic properties which may be comparable to those of a muscle actomyosin preparation in which the proportion of actin to myosin is very small.

VIII. The possible role of the contractile protein of plasmodium in protoplasmic streaming is discussed.

References

- Bowen, W. J., and T. D. Kerwin, 1954a: Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) on ATPase activity. *Federation Proc.* 13, 16.
- 1954b: A study of the effects of ethylenediaminetetraacetic acid on myosin adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* 211, 237—247.
- 1954c: The kinetics of myokinase. I. Studies of the effects of salts and pH and of the state of equilibrium. *Arch. Biochem. Biophys.* 49, 149—159.
- and M. Gershfild, 1957: The effect of monovalent salts on the acceleration of myosin B ATPase by magnesium. *Biochim. Biophys. Acta* 24, 315—323.
- Camp, W. G., 1936: A method of cultivating myxomycete plasmodia. *Bull. Torrey Bot. Club* 63, 205—210.
- Chappell, J. B., and S. V. Perry, 1955: The stimulation of the adenosinetriphosphatase activities of myofibrils and L-myosin by 2, 4-dinitrophenol. *Biochim. Biophys. Acta* 16, 285—287.
- Csapo, A., 1949: The adenosinetriphosphatase (ATPase) activity of uterine muscle. *Acta Physiol. Scand.* 19, 100—114.
- Engelhardt, W. A., 1958: Enzymology and mechanochemistry of tissues and cells. *Proc. Intern. Symp. Enz. Chem.* 34—39. Maruzen Co., Ltd., Tokyo.
- Fiske, C. H., and Y. Subbarow, 1925: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375—400.
- Friess, E. T., 1954a: Effect of a chelating agent on myosin ATPase. *Federation Proc.* 13, 49.
- 1954b: The effect of a chelating agent on myosin ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 51, 17—23.
- M. F. Morales, and W. J. Bowen, 1954: Some further observation on the interaction of EDTA with the myosin-ATP system. *Arch. Biochem. Biophys.* 53, 311—313.
- Greville, G. D., and D. M. Needham, 1955: Effect of 2, 4-dinitrophenol and phenylmercuric acetate on enzymic activity of myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 16, 284—285.
- 1956: Effects of 2, 4-dinitrophenol and other agents on the nucleotide triphosphatase activities of L-myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 440—442.

- Hasselbach, W., 1952: Die Umwandlung von Aktomyosin-ATPase in L-Myosin-ATPase durch Aktivatoren und die resultierenden Aktivierungseffekte. *Z. Naturforsch.* 7 b, 163—174.
- Hatano, S., and I. Takeuchi, 1960: Energy-rich phosphate compounds in the slime mould and their levels in relation to some external conditions. *Protoplasma* (in press).
- Kamiya, N., H. Nakajima, and S. Abe, 1957: Physiology of the motive force of protoplasmic streaming. *Protoplasma* 48, 94—112.
- 1959: Protoplasmic streaming. *Protoplasmatologia* 8, 3 a. Springer-Verlag, Wien.
- Kielley, W. W., and L. B. Bradley, 1956: The relationship between sulphydryl groups and the activation of myosin adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* 218, 653—659.
- Loewy, A. G., 1952: An actomyosin-like substance from the plasmodium of a myxomycete. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 40, 127—156.
- Mommaerts, W. F. H. M., and K. Seraidarian, 1947: A study of the adenosine triphosphatase activity of myosin and actomyosin. *J. Gen. Physiol.* 30, 401—421.
- 1948: The reaction between actomyosin and adenosine triphosphate. *J. Gen. Physiol. (Am.)* 31, 361—375.
- 1950: Muscular contraction. Interscience publishers, Inc., New York.
- and I. Green, 1954: Adenosinetriphosphatase systems of muscle III. A survey of the adenosinetriphosphatase activity of myosin. *J. Biol. Chem.* 208, 833—843.
- Needham, D. M., 1942: The adenosinetriphosphatase activity of myosin preparations. *Biochem. J.* 36, 113—120.
- 1952: Adenosine triphosphate and the structural proteins in relation to muscle contraction. *Adv. Enzymology* 13, 151—193.
- and J. M. Cawkwell, 1956: Some properties of the actomyosin-like protein of the uterus. *Biochem. J.* 63, 337—344.
- — 1958: Uterus actomyosin. *Biochem. J.* 68, 31 P.
- Polis, B. D., and O. Meyerhof, 1947: Studies on adenosinetriphosphatase in muscle I. Concentration of the enzyme on myosin. *J. Biol. Chem.* 169, 389—401.
- Portzehl, H., G. Schramm, and H. H. Weber, 1950: Aktomyosin und seine Komponenten. *Z. Naturforsch.* 5 b, 61—74.
- Stekol, J. A., 1959: Biochemistry in the U.S.S.R. *Ann. Rev. Biochem.* 28, 605—636.
- Szent-Györgyi, A., 1951 a: Chemistry of muscular contraction, 2nd ed. Academic Press, New York.
- 1951 b: A new method for the preparation of actin. *J. Biol. Chem.* 192, 361—369.
- Takata, M., 1957: Physiological studies on the protoplasmic streaming in plasmodia by means of microdissection. 22nd Ann. Meet. Bot. Soc. Japan.
- Tomomura, Y., S. Watanabe, and K. Yagi, 1953: Mechanism of muscular contraction I. Interaction between actomyosin and adenosine triphosphate. *J. Biochem.* 40, 27—54.
- K. Yagi, and H. Matsumiya, 1955: Contractile proteins from adductors of pecten I. Some enzymic and physicochemical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 59, 76—89.
- Matsumiya, and S. Kitagawa, 1957 a: The effect of EDTA on the interaction between actomyosin and adenosine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 24, 568—576.
- F. Morita, and K. Yagi, 1957 b: Combination of pyrophosphate with actomyosin studied by the change of light scattering. *J. Physic. Chem.* 61, 605—609.

- Tomomura, Y., and A. T. Sasaki, 1957 c: Some observations on the contractile protein from smooth muscle of oesophagus. *Enzymologia* 18, 111—119.
- Ts'o, P. O. P., J. Bonner, L. Eggmann, and J. Vinograd, 1956 a: Observations on an ATP-sensitive protein system from the plasmodia of a myxomycete. *J. Gen. Physiol.* 39, 325—347.
- L. Eggman, and J. Vinograd, 1956 b: The isolation of myxomyosin, an ATP-sensitive protein from the plasmodium of a myxomycete. *J. Gen. Physiol.* 39, 801—812.
- — — 1957 a: The interaction of myxomyosin with ATP. *Arch. Biochem. Biophys.* 66, 64—70.
- — — 1957 b: Physical and chemical studies of myxomyosin, an ATP-sensitive protein in cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 532—542.
- Watanabe, S., Y. Tomomura, and H. Shiokawa, 1953: Mechanism of muscular contraction II. Kinetic studies on muscle ATPase. *J. Biochem.* 40, 387—402.
- Yagi, K., 1957: Contractile proteins from adductors of pecten IV. Constitution of myosin B. *J. Biochem.* 44, 337—345.

Cuscuta als Überträger des Crown-gall-erzeugenden Prinzips

Von

Helga Kelbitsch

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Februar 1960)

Der Erreger des eigentlichen Pflanzenkrebses (Crown-gall) wurde von Smith und Townsend (1907) aus einem Tumor von *Chrysanthemum frutescens* isoliert. Sie nannten diesen Mikroorganismus *Bacterium tumefaciens*. Heute heißt dieses Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn.

Ein Tumor durch dieses Bakterium entsteht nur dann, wenn eine Pflanze verwundet wird, wobei sich Wundhormone bilden. Durch Versuche von Stapp (1953) und Rack (1954) konnte dies bewiesen werden: sie infiltrierten eine Suspension von *Agrobacterium tumefaciens* (im folgenden mit A. t. abgekürzt) durch die Spaltöffnungen in die Interzellularen junger *Solanum lycopersicum*-Pflanzen und *Bryophyllum daigremontianum*-Blätter. Obwohl in den Interzellularen durch gleichzeitig eingebrachte pflanzeigene Preßsäfte und Nährlösungen für die Bakterien optimale Lebensbedingungen herrschten, gelang es nicht, auf diese Weise — also ohne Verletzung — Tumoren zu erhalten. Wird aber eine Wunde mit A. t. infiziert, so genügt es nach Braun (1943), daß das Bakterium nur vier Tage auf die normalen Zellen einwirkt, um sie in Krebszellen überzuführen.

Unter einem Pflanzenkrebs versteht man nach Dame (1938), Rack (1954) eine Gewebewucherung, die durch Hypertrophie und Hyperplasie der Geschwulstzellen, jeweils begleitet von zahlreichen völlig regellosen Teilungen, gekennzeichnet ist. Die Zellen haben autonomes, richtungsloses Wachstum. Wahllös verstreut findet man Nester meristematischer Zellen. Erst später tritt eine gewisse Differenzierung zu Tracheiden- und Tracheenbündeln ein, die sich aber auch völlig ungeordnet und regellos im Tumorgewebe ausbreiten und eine höchst unvollkommene Verbindung mit den Leitungsbahnen ihrer Wirtspflanze besitzen.

Junge Tumoren sind meist zart und weich und haben eine grünlichweiße bis hellbraune Oberfläche. Ältere Tumoren verkorken und zeigen eine mehr oder weniger zerklüftete, dunkle Oberfläche.

In der Natur kommt es häufig auf folgende Weise zur Tumorbildung: A. t. bleibt nach R i k e r (1922) im Ackerboden einige Jahre virulent. Durch Wunden, die bei der Veredlung und beim „Putzen“ junger Obstbäume, durch kleine Frostrisse oder durch Wildfraß entstehen, kann das Bakterium eindringen und eine Krebsbildung veranlassen.

Eine Wunde entstehe nach K i n d e r m a n n (1928), wenn die Haustorien von *Cuscuta* in eine Wirtspflanze eindringen. Auch S c h u m a c h e r und H a l b s g u t h (1939) beobachteten, daß das Gewebe der Wirtspflanze zerstört wird, wenn die Haustorien in sie hinein zum Phloem vordringen.

Wir haben uns nun die Frage gestellt, ob es auch bei Verwundung einer Wirtspflanze durch die Haustorien von *Cuscuta* und gleichzeitiger Infektion mit A. t. zu einer Crown-Gall-Bildung kommen kann. Es ist uns keine Arbeit bekannt, die sich mit dieser Frage befaßt.

Zu den Versuchen wurde *Cuscuta Gronovii* verwendet, eine Art, deren Samen relativ leicht keimen. Als Wirtspflanzen eigneten sich besonders: *Pelargonium zonale*, *Tropaeolum majus*, *Impatiens balsamina*, *I. holstii*, *I. parviflora*, *I. sultani*, *Helianthus annuus* und *Chrysanthemum coronarium*.

Versuch 1:

Cuscuta Gronovii, die im Begriff stand, die Epidermis der Wirtspflanze mit den Haustorien zu durchdringen, wurde einige Tage hindurch mit einer A. t.-Suspension bestrichen. Dabei wurde darauf geachtet, daß ein Tropfen Bakterien-Suspension an der Kontaktstelle zwischen *Cuscuta* und Wirt hängenblieb. Diese Behandlung er-



Abb. 1. Blatt von *Pelargonium zonale*. Die Haustorien der *Cuscuta* sind vor dem Eindringen mit A. t.-Suspension bestrichen worden. Es entstand eine Geschwulst.

folgte so lange, bis die Haustorien vollständig in den Wirt eingedrungen waren.

Etwa an der Hälfte der behandelten Wirtspflanzen traten Tumorbildungen, oft schon 10 Tage nach der Infektion, auf. Dieser Versuch führte allerdings nicht immer zu einer Tumorbildung; vielleicht ist es den Bakterien nicht immer möglich, in die Wunde zu kommen oder die Bakterien-Suspension vertrocknet vorzeitig. Die Geschwülste erreichten durchschnittlich den doppelten Durchmesser des Sprosses, sie traten besonders häufig an Blattstielen auf (Abb. 1). Die krebsskranken Blätter welkten dann allerdings

bald und fielen nach kurzer Zeit ab. Die Versuche ergaben bei allen verwendeten Wirtspflanzen das gleiche Resultat.

Versuch 2:

Kontrollversuche mit gesunder, d. h. A. t.-freier *Cuscuta* wurden mit gleichfalls A. t.-freien Wirtspflanzen durchgeführt. In keinem einzigen Fall ergaben sich Tumoren. Dies wurde bei folgenden Pflanzen festgestellt: *Brassica nigra*, *Crassula argentea*, *Kalanchoë blossfeldiana*, *Pelargonium zonale*, *Tropaeolum majus*, *Impatiens balsamina*, *I. holstii*, *I. parviflora*, *I. sultani*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solidago canadensis*, *Helianthus annuus* und *Chrysanthemum coronarium* (Abb. 2).

Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch schon frühere Autoren. So schreibt Koch (1874), 23: „Eine Wucherung des Gewebes der Nährpflanze an der Stelle, wo die Haustorien eindringen, ... wird durch *Cuscuta* nicht veranlaßt.“ Ebenso beobachteten Peirce (1894) und Walzel (1948), daß verschiedene Wirte selbst bei stärkstem Befall durch *Cuscuta*-Arten, niemals eine Gewebewucherung zeigten. Es liegen aber auch gegenteilige Angaben vor. So erzielte Dean (1937) Tumorbildungen mit *Cuscuta*, u. zw. an sehr vielen verschiedenen Wirtspflanzen. Auf dieses unseren Beobachtungen widersprechende Ergebnis wird noch zurückzukommen sein.

Unsere Versuche haben demnach ergeben, daß die Verwundungen, die *Cuscuta*-Haustorien in der Wirtspflanze hervorrufen, genügen, um an ihr in Gegenwart von A. t. einen Tumor zu induzieren.

Cuscuta wird seit den ersten Versuchen von Bennett (1940) in der pflanzlichen Virologie sehr häufig mit Erfolg als Virusüberträger verwendet. So hat z. B. K u n k e l (1945) mit Hilfe von *Cuscuta* ein Virus auf 28 Spezies aus 10 verschiedenen Familien übertragen. Der Parasit erkrankt dabei selbst nicht, er fungiert also lediglich als latenter Virusträger. Dies führt uns nun zu folgender Frage:

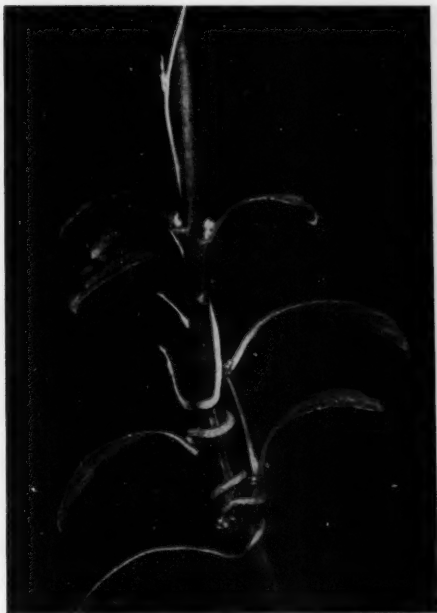


Abb. 2. *Impatiens balsamina* mit A. t.-freier *Cuscuta*. *Cuscuta*-Befall allein verursachte keinerlei Gewebewucherung.

Ist es möglich, das tumorinduzierende Agens mit Hilfe von *Cuscuta* von einer tumortragenden Pflanze auf eine gesunde, d. i. Crown-gall-freie Pflanze zu übertragen und diese dadurch zur Tumorbildung zu veranlassen?

Versuch 3:

Cuscuta Gronovii, die auf gesunden Pflanzen parasitierte und üppig wuchs, wurde durch Einstich und Ritzen mit A. t. infiziert. Obwohl die dabei gesetzte Verwundung sehr gering war, starb der Parasit meist schon

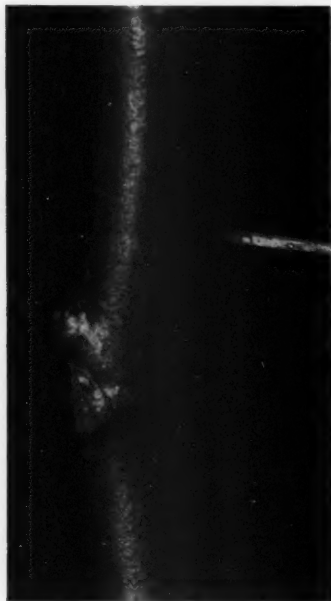


Abb. 3. *Pelargonium zonale* mit Tumor. *Cuscuta* ist mit A. t. infiziert worden und brachte eine Tumorbildung hervor. Die *Cuscuta* selbst starb bald ab.

am nächsten Tag ab, ohne daß eine Veränderung an ihm oder an der Wirtspflanze eingetreten wäre. Unter 10 Pflanzen bildete jedoch eine an der Stelle, wo die Haustorien der mit A. t. infizierten *Cuscuta* eindringen, einen Tumor; er erreichte nach 50 Tagen etwa Erbsengröße (Abb. 3). Am Parasiten entstand auch bei diesem Versuch um die Einstichstelle eine Nekrose; er selbst bildete keinen Tumor.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß eine mit A. t. infizierte *Cuscuta* auf der Wirtspflanze, auf der sie parasitiert, eine Wucherung hervorrufen kann.

Eine bloße Überleitung von Nekrohormonen, wenn eine solche überhaupt stattfindet, kann jedenfalls nicht als Ursache für die Tumorbildung angesehen werden; *Cuscuta*-Pflanzen, die mit steriler Nadel verletzt worden waren, bildeten wohl Nekrosen aus, niemals aber entstanden an der Wirtspflanze Tumoren.

Versuch 4:

Zu einer weiteren Serie von Versuchen, das tumorinduzierende Agens durch *Cuscuta* zu übertragen, wurden junge etwa 2 cm lange *Cuscuta*-

Keimlinge an Pflanzen befestigt, die nach Impfung mit A. t. bereits eine Krebsgeschwulst entwickelt hatten. Nach wenigen Tagen drangen die Haustorien in den Stamm oder den Blattstiel der Wirtspflanze ein und verursachten an der Eindringstelle Sekundärtumoren. Am Blattstiel entstanden sie innerhalb von 14 bis 30 Tagen, und zwar in einer Entfernung von 4 bis 12 cm vom Primärtumor. Die Sekundärtumoren erlangten hier ungefähr Erbsengröße und hatten eine hellere oder rötlichbraune, glatte bis etwas zerklüftete Oberfläche. Der Tumor unterband offenbar die Wasserzufuhr durch den Blattstiel, die Blätter begannen sehr bald zu welken und fielen nach

einigen Tagen ab. Am Hauptstamm fanden sich die Sekundärgeschwülste bis 14 cm oberhalb und 14 cm unterhalb der Primärinfektion; sie entwickelten sich etwas langsamer und ähnelten eher den Primärtumoren (Abb. 4).

Im allgemeinen glichen derartige durch *Cuscuta* veranlaßte Wucherungen den Metastasenbildungen, die auch manchmal ohne Einfluß von *Cuscuta* in Form beulenartiger Verdickungen am Blattstiel und Hauptstamm auftraten (Abb. 5).



Abb. 4.

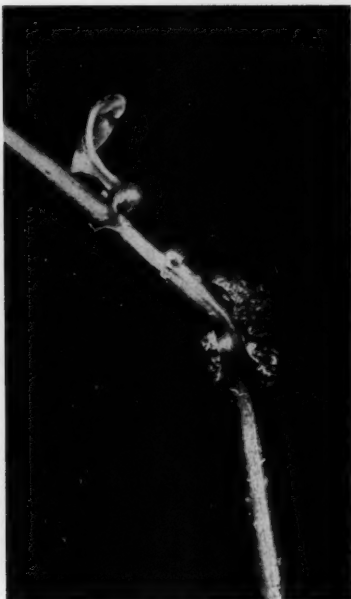


Abb. 5.

Abb. 4. *Impatiens sultani*. Oben Primärkrebs. In der Mitte Adventivwurzeln. Unten, durch ursprünglich A. t.-freie *Cuscuta* veranlaßte Sekundärgeschwülste.

Abb. 5. *Impatiens sultani*. Unten Primärtumor. Oben anschließend und am Blattstiel normaler Sekundärtumor.

Schon Hamdi (1929) hat festgestellt, daß Sekundärtumoren im Vergleich zu Primärtumoren eine glattere Oberfläche haben. In der Erklärung der Erscheinung der Sekundärbildung durch *Cuscuta* schließen wir uns der Meinung der Autoren an, die eine Verletzung des tumortragenden Stammes zur Sekundär-Tumorbildung für notwendig halten. Nach Stapp (1939, 1953, 1958), Bieber und Wartenberg (1957) kann nun diese Verletzung durch einen sterilen Nadelstich an Stellen, die mit den Leitungsbahnen der Primärinfektion korrespondieren, oder durch das vorzeitige Ablösen von Blättern erfolgen. Da in beiden Fällen von sogenannten Tumorsträngen bei

Querschnitten nichts zu sehen war, nimmt man an, daß die in den Leitungsbahnen sich ausbreitenden Bakterien das Gewebe zur Tumorbildung anregen, wenn Kallus entsteht.

Im Falle unserer Versuche fügte also die *Cuscuta* dem Wirt die Verletzung zu und regte zur Tumorbildung an.

Versuch 5:

Leitete man den Parasiten, der in unmittelbarer Nähe des Primärtumors eine Sekundärgeschwulst erzeugt hatte, zu gesunden Pflanzen über, so entstand an den Stellen, wo die Haustorien in die Epidermis und das darunterliegende Gewebe des zweiten Wirtes eindringen, nach 14 bis 20 Tagen wiederum ein „Krebs“. Er trat sowohl an dem Blattstiel wie am Hauptstamm auf und wuchs bis zur 2—4 fachen Sproßdicke heran.



Abb. 6. *Helianthus annuus*. Durch *Cuscuta* von krebskranken *Impatiens* auf gesunden *Helianthus* „übertragener Tumor“.

Auch „Tumorübertragungen“ zwischen verschiedenen Wirtspflanzen gelangen. *Cuscuta*, die von einer krebskranken *Impatiens*-Pflanze ausging, erzeugte an gesundem *Pelargonium*, *Tropaeolum* und *Helianthus* Tumoren (Abb. 6, 7).

Dafür, daß es sich bei diesen neuen Geschwülsten tatsächlich um neue Tumoren handelt, spricht das Ergebnis folgender Pfropfversuche: kleine Stücke dieser Geschwulst wurden auf acht *Tropaeolum*-Pflanzen transplantiert. Nach 28 Tagen bildeten sich bei fünf Pflanzen Höcker und Anschwellungen.

Das Gelingen des Versuches, mit Hilfe von *Cuscuta* Tumoren von einer Pflanze auf eine andere zu übertragen, d. h., auf einer zweiten Wirtspflanze mit Hilfe der *Cuscuta*, die von einer tumortragenden Pflanze kommt, Tumorbildung auszulösen, veranlaßt nun die Frage: Wie kommt diese „Übertragung“ zustande?

Es ist da an zwei Möglichkeiten zu denken:

1. Es wandert der Erreger, d. h. das Bakterium, selbst durch die *Cuscuta* von der ersten zur zweiten Wirtspflanze und löst dort eine Tumorbildung aus.

2. Es wandert nicht das *Agrobacterium* selbst, sondern das in der ersten Pflanze von diesem erzeugte „tumorinduzierende Prinzip“.

Die erste Möglichkeit ließ sich bisher zwar noch nicht mit Sicherheit ausschließen, doch spricht manches gegen sie.

So ist es fraglich,

1. ob in der ersten Wirtspflanze, die zur Zeit des *Cuscuta*-Befalles bereits einen Tumor entwickelt hatte, überhaupt noch Bakterien vorhanden waren,

2. ob die Bakterien in die Haustorien der *Cuscuta* eindringen und in ihr zur zweiten Pflanze wandern können.

Wiederholte eigene Versuche, in der *Cuscuta Agrobacterium tumefaciens* durch Färbung oder Reinkultur nachzuweisen, sind bisher negativ ausgefallen.

Es scheint daher die zweite Möglichkeit die höhere Wahrscheinlichkeit zu besitzen, daß nicht das Bakterium, sondern ein tumor erzeugendes Prinzip durch die *Cuscuta* weitergeleitet wird.

Was aber ist dann das geschwulstauslösende Prinzip?

Eine eindeutige Entscheidung ist bisher darüber nicht gefallen. Braun und Stonier (1958, S. 46) haben über die in Betracht kommenden Möglichkeiten eine klare kritische Darstellung gegeben: Das tumorinduzierende Prinzip „may be either (1) a metabolic product of the crown gall bacterium. (2) a normal host constituent that is converted by the bacteria into a carcinogenic principle, (3) a chemical fraction of bacterial cell that is capable of initiating, as in the case of the transforming substance (desoxyribonucleic acid) of the pneumococci, a specific alteration with a resultant continued and, in this instance, abnormal development of those cells, (4) a virus associated with and transmitted by the crown gall bacteria, (5) the crown gall bacteria themselves, which enter the wounded cells and become so altered in their morphology and physiology as not to be demonstrable by either isolation or staining procedures“¹.

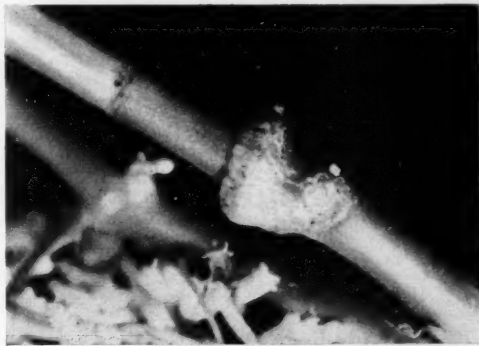


Abb. 7. *Pelargonium zonale*. Durch *Cuscuta* von krebserkranktem *Pelargonium* übertragener Tumor.

Bei der Auswertung unserer Versuche fallen die Punkte 2 und 3 weg, weil bis jetzt kein *Agrobacterium tumefaciens* in der *Cuscuta* nachgewiesen werden konnte. Zwischen der Übertragung von Virus durch *Cuscuta* und von Crown-gall-erzeugendem Agens bestehen, wie unsere Versuche gezeigt haben, weitgehende Ähnlichkeiten.

Es liegt daher nahe, unter den genannten fünf Möglichkeiten die vierte besonders in Betracht zu ziehen. Es wäre also wohl denkbar, daß *Cuscuta*

¹ Man vergleiche auch die jüngsten kritischen Erörterungen von Gautheret (1959), 779, über das Wesen des „principe inducteur“ sowie die wichtigen Arbeiten von Bender und Brucker 1956/59.

einen aus A. t. freiwerdenden Phagen weiterzuleiten und zu übertragen vermag, wenn auch Versuche in dieser Hinsicht bisher kein positives Ergebnis gebracht haben (Beardsley 1955). Sollte die hauptsächlich von Ropp (1947) vertretene Virus-Hypothese aber zurecht bestehen, so ließe sich das mit den sonstigen Befunden in Widerspruch stehende Ergebnis von Dean (1937) wie folgt aufklären: Die *Cuscuta*, mit der Dean (vgl. S. 439) an Wirtspflanzen ohne Infektion mit A. t. Tumoren erzeugen konnte, war möglicherweise ein symptomloser Virusträger, wobei das Virus erst im Wirt durch Tumorbildung manifest wurde.

Zusammenfassung

1. Gesunde *Cuscuta* wurde knapp vor dem Eindringen ihrer Haustorien in die Wirtspflanze wiederholt mit einer *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension bestrichen. In der Hälfte der Fälle traten an den behandelten Stellen des Wirtes Crown-gall-Tumoren auf.

2. Wurden auf Wirtspflanzen A. t.-freie *Cuscuta* parasitieren gelassen oder der Stamm des Wirtes mit einer A. t.-Suspension ohne Verletzung bestrichen, so traten niemals tumorartige Gewebewucherungen auf.

3. Wurde die *Cuscuta*, die auf einem krebsfreien Wirt wächst, mit A. t. infiziert, so bildete die Wirtspflanze einen Tumor, wenn der Parasit nicht bei der Infizierung vorzeitig zugrunde ging.

4. Dringen die Haustorien von *Cuscuta* in eine krebstragende Nährpflanze, so treten an diesen Stellen stets Sekundärtumoren auf.

5. Leitet man *Cuscuta*, die knapp neben einem Primärtumor parasitiert und dort bereits einen Sekundärtumor hervorgerufen hat, zu gesunden Pflanzen weiter und läßt sie dort Haustorien bilden, so entsteht an diesen zweiten Wirtes gleichfalls eine tumorähnliche Geschwulst.

Zwischen der Übertragung des tumorinduzierenden Agens und der schon lange bekannten Virusübertragung durch *Cuscuta* besteht eine große Ähnlichkeit. Die hier mitgeteilten Versuche sprechen daher für die Virushypothese der Crown-gall-Bildung.

Dem Vorstand des Instituts für Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Herrn Prof. Dr. Otto Härtel, danke ich für die Überlassung des Themas.

Frau Dozent Dr. Irma Thaler bin ich für die ständige wertvolle Förderung meiner Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

- Beardsley, R. E., 1955: Phage production by crown-gall bacteria and the formation of plant tumors. *Amer. Naturalist* 89, 175.
 Bender, E., und W. Brucker, 1956: Studien zur zellfreien Tumorübertragung an Pflanzen I. *Z. Bot.* 44, 531.
 — — 1958: Studien zur zellfreien Tumorerzeugung an Pflanzen II. *Z. Bot.* 46, 121.
 — — 1959: Weitere Versuche zur zellfreien Tumorerzeugung an Pflanzen III. *Z. Bot.* 47, 258.

- Bennett, C. W., 1940: Acquisition and transmission of viruses by dodder (*Cuscuta subinclusa*). *Phytopathol.* 30, 2.
- Bieber und Wartenberg, 1957: Untersuchungen der Sekundärtumoren beim bakteriellen Pflanzenkrebs an *Helianthus annuus*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 70, 205.
- Braun, A. C., 1945: Studies on tumor inception in the crown-gall disease. *Amer. J. Bot.* 30, 674.
- Braun, A. C., and T. Stonier, 1958: Morphology and Physiology of Plant Tumors. *Protoplasmatologia* 10, 1.
- Dame, F., 1958: *Pseudomonas tumefaciens*, der Erreger des Wurzelkropfes, in seiner Beziehung zur Wirtspflanze. *Zbl. Bakteriologie* 11, 98, 385.
- Dean, H. L., 1937: Gall formation in host plants following haustorial invasion by *Cuscuta*. *Amer. J. Bot.* 24, 167.
- Gautheret, R. J., 1959: La culture des tissus végétaux. Paris.
- Hamdi, H., 1929: Über die Histogenese, Bau und Natur des sogenannten Pflanzenkrebses und dessen Metastasen. *Z. Krebsforsch.* 30, 547.
- Kindermann, A., 1928: Haustorialstudien an *Cuscuta*-Arten. *Planta* 5, 769.
- Koch, L., 1874: Über die Entwicklung der *Cuscuta*. *Hansteins bot. Abh.* 2, 25.
- Kunkel, L. O., 1945: Studies on cranberry false-blossom. *Phytopathol.* 35, 805. Zitiert nach Sorauer (1954): Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Viruskrankheiten, 6. Auflage, 2, 62. Berlin und Hamburg.
- Peirce, G. J., 1894: A Contribution to the Physiology of the Genus *Cuscuta*. *Annal Bot.* 8, 53.
- Rack, K., 1954: Untersuchungen über die Bedeutung der Verwundung und über die Rolle von Wuchsstoffen beim bakteriellen Pflanzenkrebs. *Phytopatholog. Z.* 21, 1.
- Riker, A. J., 1922: Pflanzenpathogene Bakterien. Berlin, Hamburg. (Zitiert nach C. Stapp 1958).
- Ropp, R. de, 1947 b: The growth-promoting and tumefacient factors of bacteria-free crown-gall tumor tissues. *Amer. J. Bot.* 34, 248.
- Schumacher, W., und W. Halbsguth, 1939: Über den Anschluß einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Ein Beitrag zum Plasmodemesmenproblem. *Jb. wiss. Bot.* 87, 324.
- Smith und Townsend, 1907: Ein Pflanzentumor bakteriellen Ursprungs. *Zbl. Bakteriologie* 11, 20, 89.
- Stapp, C., 1959: Bakterielle Pflanzenerkrankungen. *Zbl. Bakteriologie* 1, 144, 94.
- 1953: Der derzeitige Stand unserer Kenntnisse über pflanzliche Tumoren. *Zbl. Bakteriologie* 11, 107, 172.
- 1958: Pflanzenpathogene Bakterien. Berlin, Hamburg.
- Walzel, G., 1948: Sterile Kultur von *Cuscuta* und einige weitere Beiträge zur Kenntnis dieses Parasiten. Diss. Universität Graz.

Die Eiweißkristalle von *Capsicum annuum* sind Viruskörper

Von

Davor Miličić und Zlata Udjbinac

Aus dem Botanischen Institut der Naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät
Zagreb

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Februar 1960)

Einleitung

In den Zellen vieler höheren Pflanzenarten befinden sich regelmäßig als ihre normalen Zellinhaltskörper sehr verschiedene Eiweißkristalle; ihr Vorkommen ist zusammenfassend in den Werken von Zimmermann (1893), Molisch (1921) und Meyer (1920) dargestellt. Die meisten von ihnen sind in der Zeit entdeckt, als noch nicht bekannt war, daß Eiweißkristalle auch nach einer Virusinfektion entstehen können.

Zum ersten Male wurden die Proteinkristalle durch Iwanowski (1903) in Zusammenhang mit einer Virusinfektion gebracht. Er hat in den Zellen der Tabakpflanzen, die mit Tabakmosaikvirus (TMV) infiziert waren, kristalline Körper gefunden, die in gesunden Pflanzen gänzlich fehlten. Diese von TMV verursachten Kristalle erscheinen in den kranken Pflanzen am häufigsten in Form von hexagonalen Prismen, die oft aus amorphen X-Körpern durch allmähliche Anhäufung von kristallinem Material entstehen. Nach dieser Entdeckung wurde festgestellt, daß nicht nur das TMV, sondern auch viele andere Viren das Erscheinen von Eiweißkristallen im Cytoplasma und im Zellkern der erkrankten Pflanzen verursachen können. Die Namen dieser Viren und die Angaben über die Lokalisation ihrer Kristalle im Gewebe der Wirtspflanzen sind bei Bawden (1950), Goldin (1954) und Köhler und Klinkowski (1954) zu finden. Unlängst haben Miličić (1956) und Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958) konstatiert, daß Eiweißkristalle auch unter dem Einfluß eines noch nicht näher bekannten Virus entstehen können, das bei *Alliaria officinalis* eine Mosaikkrankheit hervorruft. (Vgl. auch Reiter und Weber 1960.)

Da die zahlreichen normalen Kristalle in jener Zeit gefunden wurden, als man über Viren und ihre Kristalle fast noch nichts wußte, konnten die Viruskristalle leicht mit den normalen verwechselt werden. Das ist mit den Eiweißspindeln der Kakteen geschehen, die von Molisch (1885) entdeckt und von ihm als normale Gebilde, und zwar als Reservestoffe betrachtet wurden. Erst im Jahre 1951 hat das Pflanzenphysiologische Institut in Graz Untersuchungen an den Eiweißspindeln mit dem Zwecke begonnen (Rosenzopf 1951; Weber 1951; Weber und Kenda 1952; Weber, Kenda und Thaler 1952), ihre Natur zu überprüfen und festzustellen, ob sie nicht Viruskörper sind. Bei den Untersuchungen an den Eiweißspindeln waren die Schwierigkeiten auch deshalb sehr groß, weil sich die Kakteen mit Spindeln von den normalen spindelfreien Pflanzen nur durch die Anwesenheit der Spindeln unterschieden und keine äußeren Krankheitssymptome zeigten, die sonst bei vielen anderen viruskranken Pflanzen regelmäßig vorkommen. Als nach dieser Nachprüfung der Eiweißspindeln es schon gewiß wurde, daß diese Körper keine normalen, sondern Virusgebilde sind, haben Weber, Kenda und Thaler (1952) folgende Meinung geäußert: „Es wird jedenfalls von Interesse sein, jede Species, von der bisher Eiweißkristalle im Cytoplasma oder Zellkern bekannt sind, daraufhin zu prüfen, ob sie nicht doch als gesunder Virusträger in Betracht kommt.“

Nach diesen Untersuchungen an Kakteen wurden auch einige andere schon früher bekannte Proteinkristalle mit Rücksicht auf ihre eventuelle Virusnatur nachgeprüft. Zuerst seien die Eiweißwürfel aus den peripheren Geweben der Kartoffelknolle erwähnt, die in letzter Zeit von Reiter (1956), Fedotina (1957) und Hölzl und Bancher (1958) untersucht wurden. Alle diese Autoren sind der Ansicht, daß diese Proteinwürfel keine Viruskörper sind. Ebenso wurde nach wiederholten Untersuchungen die Meinung vertreten, daß auch die Eiweißspindeln verschiedener *Drosera*- (Weber 1954) und *Valerianella*-Arten (Thaler 1954) normale Gebilde darstellen, die in keinem Zusammenhang mit einer Virusinfektion stehen. Was die Frage über die Natur der Eiweißspindeln der *Impatiens*-Arten anbelangt, haben die bisherigen Untersuchungen dieses Problem noch nicht völlig gelöst, wie das aus den Arbeiten von Weber (1954), Goldin und Fedotina (1956) und Thaler (1956) hervorgeht. Für die Eiweißspindeln aus den Blättern gewisser *Impatiens holstii*-Pflanzen, die in Graz gezogen wurden, konnte Thaler (1956) experimentell feststellen, daß es sich um Gebilde handelt, die vom Virus abhängig sind. Demgegenüber befinden sich die Eiweißspindeln anderer *Impatiens*-Arten, wie z. B. von *Impatiens balsamina*, nur in den Fruchtknoten, und zwar nicht in einzelnen Pflanzen, sondern in allen untersuchten Exemplaren dieser Arten, so daß sie als regelmäßige bzw. normale Zellbestandteile dieser Arten betrachtet werden müssen (Weber 1954; Goldin und Fedotina 1956). Es scheint deshalb, daß die Spindeln von *Impatiens balsamina* und ähnlicher *Impatiens*-Arten in keinem Zusammenhang mit einer Virusinfektion stehen, obwohl sie nach den Untersuchungen von Gol-

din und Fedotina (1956) aus Makromolekeln aufgebaut sind, die sehr den langen Partikeln des TMV oder Kartoffel-X-Virus ähneln. Wir führen noch Untersuchungen von Goldin (1954 b) an den Eiweißkristallen von *Melampyrum* an, die auch in den Zellen dieser Pflanzen regelmäßig vorkommen, so daß sie demzufolge normale Zellinhaltskörper darstellen.

Beobachtungen an gesunden und infizierten Früchten

Durch diese Arbeiten angeregt, haben wir im vorigen Jahr eine Untersuchung an den Eiweißkristallen durchgeführt, die von Nestler (1906) in den Paprikafrüchten gefunden wurden. Nach den Angaben von Nestler befanden sich die prismatischen Proteinkristalle besonders häufig in jenen Zellen der inneren Fruchtepidermis, die einen Drüsencharakter besitzen.

Die Drüsen-Epidermiszellen sind nur an den Scheidewänden lokalisiert, die die Fruchthöhle unvollkommen teilen. Hier sind die Drüsen unregelmäßig und inselartig verteilt, so daß zwischen ihnen etwas größere gewöhnliche Epidermiszellen vorhanden sind. Aus der Drüsenepidermis wird ein öliges Exkret ausgeschieden, das sich zuerst zwischen der Kutikula und Epidermis-Außenwand ansammelt und dann nach außen ergießt.

In selteneren Fällen konnte Nestler die Eiweißkristalle auch in anderen Fruchtteilen finden, und zwar in den Mesokarpzellen und in jenen Zellen der Innenepidermis, die keinen Drüsencharakter besitzen, sondern als gewöhnliche Epidermiszellen oder als zierliche Sklereiden gestaltet sind.

Die Untersuchung der Eiweißkristalle hat Nestler an trockenen Früchten ausgeführt. Er hatte die Absicht, nachträglich auch das lebende Material zu erforschen, aber das hat er — soweit uns bekannt ist — nicht getan. Deshalb haben wir am Anfang des Sommers 1959 einige Paprikafrüchte (Sorte Kalinkova) durchmustert, die von aus Samen gezogenen Pflanzen stammten. In keinem von diesen Früchten konnten wir Proteinkristalle beobachten, obwohl die Früchte eingehend untersucht wurden, besonders die Drüsenepidermis an den Scheidewänden. Ebenso hatte ein negatives Ergebnis die Durchmusterung von zehn Früchten, die am Markte beschafft worden waren.

Am Ende des Sommers 1959 hatten wir die Gelegenheit, einige Früchte mikroskopisch zu untersuchen, die experimentell mit den Viren Stolbur und Tabakmosaik infiziert wurden. Dieses Material wurde uns in liebenswürdiger Weise von Frau Biljana Plavšić, Assistentin an der Philosophischen Fakultät Sarajevo, zur Verfügung gestellt. Um die Angaben über infizierte Früchte zu vervollständigen, erwähnen wir, daß die Infektion von *Capsicum annuum* mit den genannten Viren durch Pfropfung mit kranken *Solanum lycopersicum*-Pflanzen ausgeführt wurde. Die infizierten *Solanum*-Pflanzen hat Frau B. Plavšić vom Institut für Pflanzenschutz in Zagreb bekommen.

Die Durchmusterung der mit Stolbur und TMV infizierten Paprikafrüchte hat folgendes Ergebnis gebracht: Die Drüsenzellen an den Scheide-

wänden waren fast völlig mit Eiweißkristallen ausgefüllt, die der Form nach mit Nestlers Kristallen übereinstimmten (Abb. 1 a). Außerdem konnte man auch in den gewöhnlichen Epidermiszellen, die sich neben den Drüsen befanden, Eiweißkristalle wahrnehmen (Abb. 1 d und 2). Alle diese kristallinen Gebilde hatten im optischen Querschnitt die Form eines Vier- oder Sechsecks, d. h. dieselbe Form, die auch jene von Nestler (1906) gezeichnete Kristalle besaßen. Wenn wir also Nestlers Abbildungen mit unseren vergleichen, dann wird deutlich, daß es sich um dieselben Körper handelt. Die Übereinstimmung unserer Kristalle mit jenen von Nestler ist besonders schön aus Nestlers Abbildung 4 sichtbar, die auch in Linsbauers (1950) Werke „Die Epidermis“ veröffentlicht ist. Nestler meinte, daß die Kristalle aus seinen Früchten die Form von vier- und sechseckigen Prismen besitzen, daß sie also verschiedene Gebilde darstellen. Durch die genaue Beobachtung der Kristalle aus unseren Früchten vermochten wir dagegen festzustellen, daß es sich um die gleichen Kristalle handelt, und zwar um Prismen, die von der Seite gesehen die Form eines Viereckes und von oben eines Sechseckes besitzen (Abb. 2). Daß die Kristalle wirklich hexagonale Prismen sind, konnten wir durch direkte Beobachtung erschließen. Infolge der cytoplasmatischen Strömung wechselt nämlich häufig die Lage der Kristalle in der Zelle, und dann wird deutlich sichtbar, daß derselbe Kristall in verschiedenen Stellungen ein anderes Aussehen bekommt, d. h. bald das Aussehen eines Viereckes, bald eines Sechseckes.

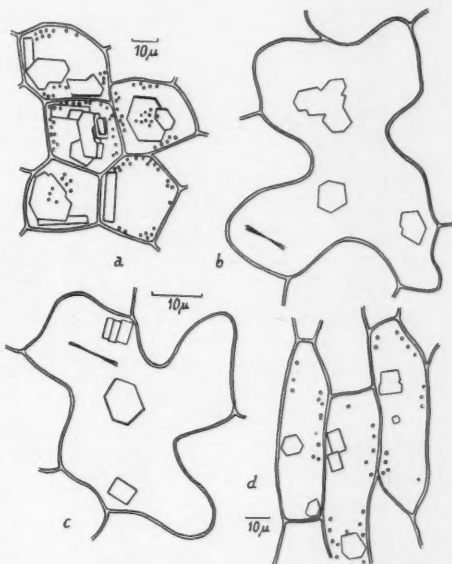


Abb. 1. *Capsicum annuum*. a Drüsenzellen und d gewöhnliche Zellen der Fruchttinnenepidermis, b und c Blattepidermiszellen. Alle Zellen enthalten Viruskristalle.

Tabakmosaikvirus-Kristalle in der Paprikafrucht

Sonst sind die hexagonalen Prismen die häufigste Form, in der das TMV innerhalb der Zellen seiner Wirtspflanzen kristallisiert. Diese Kristalle wurden im Jahre 1903 von Iwanowski entdeckt. Lange war es nicht bekannt, ob diese Proteinkörper das kristallisierte Virus oder einen anderen Eiweißkörper darstellen, der sich unter dem Einfluß des Virus vermehrt hat. Heute

ist es schon auf Grund vieler Untersuchungen gewiß, daß die hexagonalen Prismen echte Viruskristalle darstellen (vgl. Steere und Williams, 1953). Die hexagonalen Prismen sind so charakteristisch für die Tabakmosaikkrankheit, daß sie für die Identifikation dieser Virose verwendet werden können.

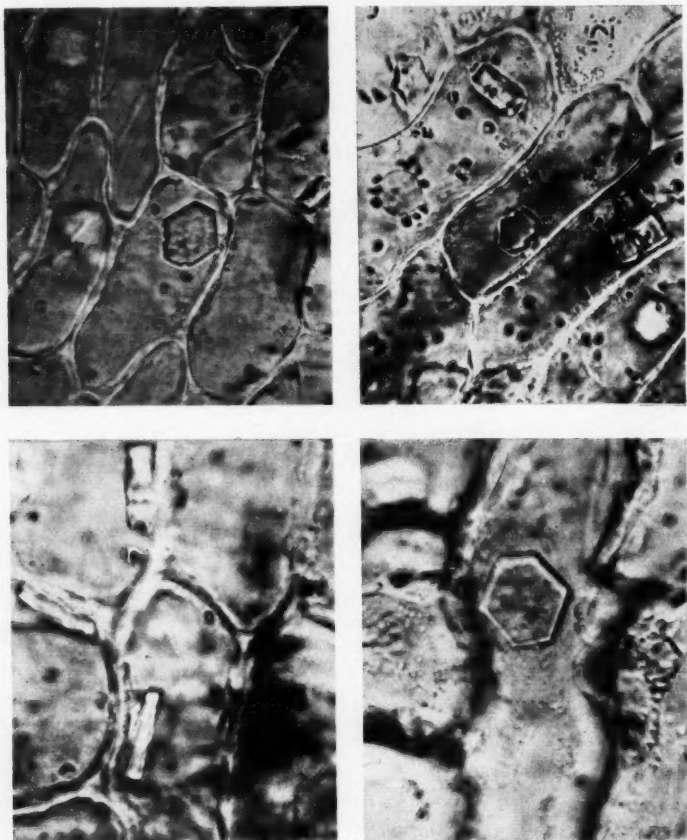


Abb. 2. Tabakmosaikvirus-Kristalle in der Fruchttinnenepidermis von *Capsicum annuum*.

Wenn die von uns und Nestler beobachteten Proteinkristalle aus Paprikafrüchten mit den hexagonalen Kristallen aus nachgewiesenen viruskranken Pflanzen verglichen werden (vgl. unsere und Nestlers Abbildungen mit den Abbildungen von Sheffield 1951, 1959), dann wird klar erkennbar, daß diese Gebilde nach ihrer Form miteinander völlig übereinstimmen. Nestler hat in seiner Arbeit angeführt, daß man manchmal

eine charakteristische Gruppierung der Kristalle wahrnehmen kann, die aus dicht aneinander stoßenden und in einer Reihe angeordneten Kristallen besteht. Dieselben Kristallgruppen sind auch unter den TMV-Kristallen, die von Sheffield (1951, Abb. 24) beschrieben sind, zu finden (vgl. auch unsere Abb. 3 b).

Außerdem ist es gut bekannt, daß die Form der Virus-Zelleinschlüsse mehr vom Virus als von der Wirtspflanze abhängig ist, so daß sich derselbe Einschlusstypus in verschiedenen Wirten wiederholt. So z. B. erscheinen die hexagonalen Prismen nicht nur bei verschiedenen Solanaceen, die mit TMV infiziert sind, sondern auch in den Wirtspflanzen aus anderen Familien (vgl. Goldin 1954, 32—33). Deshalb mußten wir erwarten, daß auch in der Solanacee *Capsicum* hexagonale Prismen nach der Infektion mit TMV entstehen werden.

Da unser Ausgangsmaterial mit zwei Viren, d. h. mit Stolbur und TMV, infiziert wurde, müssen wir betonen, daß das Stolburvirus keine intrazellularen Einschlüsse bildet, wie dies aus den Verzeichnissen der die Einschlusskörper bildenden Viren in den Werken von Goldin (1954) und Bawden (1950) hervorgeht. Sonst ist es wohlbekannt, daß sich zwei und mehrere Viren auch in derselben Pflanze vermehren können. Aus den Untersuchungen von McWhorter und Price (1949) folgt, daß das TMV und „etch“-Virus die Fähigkeit besitzen, sich in derselben Zelle zu multiplizieren und in ihr verschiedene kristalline Einschlüsse zu bilden, und zwar das TMV hexagonale Prismen im Cytoplasma und das „etch“-Virus Eiweißkristalle in den Zellkernen. Daß die angeführten Viren imstande sind, sich in derselben Zelle zu vermehren, konnten McWhorter und Price nur deshalb erkennen, weil die Form beziehungsweise die Lokalisation der Kristalle für diese Viren sehr charakteristisch ist.

Aus diesen Untersuchungen kann man auch noch schließen, daß das „etch“-Virus keinen Einfluß auf die Form des TMV-Einschlusskörpers ausübt. Deshalb konnten wir bei unseren Pflanzen ebenfalls erwarten, daß auch das Stolburvirus keine Einwirkung auf die TMV-Kristalle ausüben wird. Wie schon früher angeführt, war das in unseren infizierten Paprikafrüchten der Fall, so daß in ihnen trotz der Anwesenheit des Stolburvirus die typischen hexagonalen Prismen des TMV aufgetreten sind.

Aus der bisherigen Darstellung geht noch eine wichtige Tatsache hervor, die besonders hervorgehoben werden soll, und zwar, daß die hexagonalen Prismen einen sehr großen diagnostischen Wert für die Identifikation des TMV besitzen.

Das Tabakmosaik zeichnet sich aber noch durch einige andere Eigenschaften aus. Aus den bisherigen Untersuchungen über die Verteilung des TMV in Pflanzengewebe geht deutlich hervor, daß dieses Virus nicht an gewisse Gewebe gebunden ist, sondern daß es in allen Pflanzenteilen vorkommen kann. In dieser Eigenschaft unterscheidet sich das Tabakmosaik von der Kakteenviruskrankheit und von vielen anderen pflanzlichen und tierischen Viren, die meist nur in gewissen Geweben lokalisiert sind (Roland 1957).

Deshalb waren wir ziemlich überrascht, als wir die hexagonalen Prismen

sehr reichlich und fast ausschließlich in den Drüsenzellen gefunden haben. Außerhalb des Drüsengewebes konnten wir die Eiweißkristalle nur vereinzelt in gewöhnlichen Epidermiszellen im Bereiche der Scheidewände beobachten, sie fehlten aber durchaus in den anderen Fruchtteilen.

Da wir auf Grund der angeführten Angaben fast bestimmt wußten, daß die Proteinkristalle aus Paprikafrüchten Viruskörper sind, bemühten wir uns noch, unsere Kenntnisse über die Verbreitung dieser Kristalle bei jenen Paprikapflanzen zu vervollständigen, die in der Umgebung von Zagreb kultiviert wurden. In Zusammenhang damit haben wir folgende Untersuchungen ausgeführt. Zuerst wurden am Markte ungefähr 20 Früchte verschiedener Herkunft beschafft und dann mikroskopisch untersucht, aber nur in einer Frucht wurden die Eiweißprismen wahrgenommen. Außerdem wurde ein anderer Versuch mit 40 Paprikafrüchten vom landwirtschaftlichen Gut Botinec in der Umgebung von Zagreb ausgeführt, aber mit völlig negativem Ergebnis. Es scheint demnach, daß in Zagreb und in der Umgebung jene *Capsicum annuum*-Pflanzen, die hexagonale Prismen enthalten, nicht sehr häufig sind.

Da Nestlers (1906) Untersuchungen nur an trockenen Früchten durchgeführt wurden, konnte man annehmen, daß es sich in seinem Falle um Kristalle handelte, die erst nach Austrocknung der Früchte entstanden sind. Deshalb wurden von uns drei trockene Früchte durchmustert, aber die Proteinkristalle konnten nicht beobachtet werden. Damit war bewiesen, daß es sich nicht um Gebilde handelt, die nur in trockenen Früchten vorkommen. Um festzustellen, ob die hexagonalen Prismen die Fähigkeit besitzen, in getrockneten Früchten unverändert erhalten zu bleiben, haben wir einige die Eiweißkristalle enthaltende Querschnitte trocknen lassen. Nach mehreren Tagen, während der Durchsicht der Schnitte, konnten wir in dem gänzlich vertrockneten Material gut erhaltene Eiweißkristalle mit scharfen Umrissen wahrnehmen.

Die soeben beschriebene Untersuchung der getrockneten Früchte, wie unsere mehrmaligen Beobachtungen an lebendem Material, zeigt unzweifelhaft, daß die Eiweißkristalle keine regelmäßige Zellinhaltskörper der Paprikafrüchte sind.

Daß die Kristalle aus den infizierten Paprikafrüchten wirklich Eiweißnatur besitzen, konnten wir durch Ausführung einiger gebräuchlicher Eiweißreaktionen (Xanthoprotein-, Millonreaktion und andere) feststellen. Dieselben Farbenreaktionen geben auch die Kristalle von Nestler und ebenso die hexagonalen Prismen, die in mit TMV infizierten Solanaceen auftreten (Sheffield 1946). Daß unsere Kristalle mit jenen von Nestler übereinstimmen und daß sie sich wie die TMV-Kristalle verhalten, geht auch aus ihrer Fähigkeit hervor, nach der Methode von Zimmerman mit Säurefuchsin kräftig rot gefärbt zu werden. Mit dieser Methode sind nämlich neben unseren auch die Kristalle von Nestler (1906, 489) färbbar und nach unseren eigenen Erfahrungen auch die hexagonalen Prismen aus den mit TMV infizierten Tabakpflanzen. Wie die Kristalle von Nestler (1906), so waren auch unsere unlöslich in 96%igem Alkohol.

Übertragungsversuche und Schlußbemerkungen

Daß die von uns beobachteten hexagonalen Prismen Virusnatur besitzen, haben wir auf folgende Weise zu beweisen versucht: Als Versuchsmaterial wurden sechs Paprikapflanzen (Sorte „Babura bačka“) verwendet, die sich bei der vorhergehenden Durchsicht als frei von hexagonalen Prismen gezeigt haben. Drei von diesen Pflanzen wurden mit dem Gewebesaft inokuliert, der von jenen Paprikafrüchten stammte, die hexagonale Prismen besaßen. Die anderen drei Pflanzen dienten als Kontrolle. Die Inokulation wurde so ausgeführt, daß zuerst auf die Blattoberfläche einige Tropfen des Gewebesaftes und ein wenig Karborundpuder gesetzt wurde. Nachher wurden die Blätter mit einem Glasspatel leicht gerieben, wodurch an ihnen kleine Wunden entstanden sind, die den Kontakt der Viruspartikeln mit dem Protoplasma ermöglichten. Nach 20 Tagen wurden in den inokulierten Blättern die ersten hexagonalen Prismen wahrgenommen (Abb. 1 b, c), aber in den Früchten waren sie noch nicht zu finden. Einen Monat später, während einer neuen Durchsicht der Pflanzen, konnten wir auch in den Früchten die Prismen beobachten.

Hier bemerken wir, daß sich das Stolburvirus auf die beschriebene „mechanische“ Weise auf andere Pflanzen nicht übertragen läßt, während das TMV mechanisch übertragbar ist. Als wir die angeführten Infektionsversuche ansetzten, hatten wir die Absicht, Pflanzen zu bekommen, die anstatt mit zwei Viren nur mit TMV infiziert sind. Da die oben dargestellte Infektionsmethode für die Übertragbarkeit vieler Viruskrankheiten charakteristisch ist, beabsichtigten wir zugleich durch die Übertragung der hexagonalen Kristalle von infizierten auf gesunde und kristallfreie Pflanzen ein weiteres wichtiges Argument für ihre Virusnatur zu erreichen. Wie aus den schon angeführten Ergebnissen des Infektionsversuches hervorgeht, sind die hexagonalen Prismen in allen inokulierten Pflanzen entstanden. Damit haben wir beide erwartete Ergebnisse erreicht, d. h. wir haben einfachere Verhältnisse mit Rücksicht auf die Virusinfektion erlangt und gleichzeitig neue Indizien für den Viruscharakter der hexagonalen Prismen bekommen. Auf Grund der charakteristischen Form der Kristalle konnten wir uns wieder überzeugen, daß die hexagonalen Prismen, die sich von einer Pflanze auf die andere übertragen lassen, den Kristallen des gutbekannten und weitverbreiteten TMV angehören.

Was die Verteilung der hexagonalen Prismen in den nur mit TMV infizierten Pflanzen anbelangt, haben wir beobachtet, daß auch in ihnen die Kristalle besonders reichlich in der Drüsenepidermis vorkommen (Abb. 3). Doch konnten wir in diesen Früchten die Proteinkristalle vereinzelt auch in anderen Zellen der Innenepidermis wahrnehmen. Außerdem wurden sie auch in den über 1 mm großen Riesenzellen beobachtet, die an die innere Epidermis grenzen, dann in sehr vielen Mesokarpzellen bis zur Außenepidermis der Frucht (über Fruchtanatomie vgl. Moeller 1905).

Wenn wir diese Verteilung der Eiweißkristalle mit jener vergleichen, die in den mit Stolbur und TMV infizierten Früchten auftrat, dann können wir eine verschiedene Verteilung feststellen. Im ersten Falle, bei den zuerst

untersuchten Früchten der Sorte „Kalinkova“, waren die Kristalle an den Bereich der Scheidewände gebunden und hauptsächlich in der Drüsenepidermis lokalisiert. Demgegenüber im zweiten Falle, bei der Sorte „Babura bačka“, deren Früchte nur mit TMV infiziert waren, befanden sich die Kristalle fast in allen lebenden Perikarpzellen. Ähnliche Unterschiede in der Verteilung der Proteinkristalle wurden auch von Nestler (1906) konstatiert. Was die Ursache dieses Unterschiedes ist, ist uns noch nicht bekannt. Der Unterschied könnte vielleicht von Umständen abhängen, daß das Stol-

burvirus auf die Verteilung der Prismen einen Einfluß ausübte, daß die Früchte verschiedenen Sorten angehörten oder daß sie in verschiedener Zeit nach der Infektion untersucht wurden. So wurden z. B. die Früchte der Sorte „Kalinkova“ ungefähr sechs Monate nach der Infektion durchmustert, während die der anderen Sorte schon nach sechs Wochen. Da aus den bisherigen Untersuchungen an den TMV-Einschlußkörpern gut bekannt ist, daß sich die Tabakmosaikristalle in den infizierten Pflanzen nach einigen Monaten lösen, ist es nicht ausgeschlossen, daß auch bei der Sorte „Kalinkova“ kurze Zeit nach der Infektion die Kristalle in allen Fruchtteilen noch anwesend waren, aber daß sie sich später in anderen Geweben gelöst und nur in der Drüsenepidermis erhalten haben. In diesem letzteren Gewebe, wo sie am reichlichsten vorhanden waren, könnten sie sich wegen der dort herrschenden spezifischen Umstände bewahren.

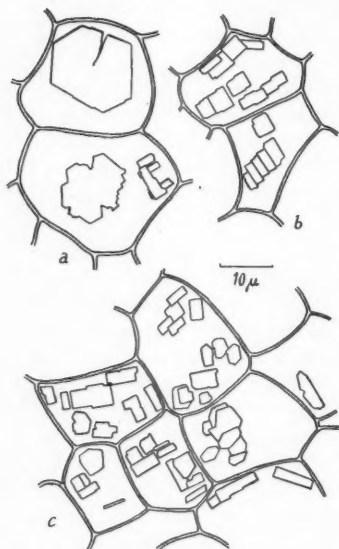


Abb. 3. Innenepidermis der *Capsicum annuum*-Frucht. Drüsenzellen mit Tabakmosaikvirus-Kristallen.

Die hexagonalen Prismen treten also am reichlichsten in den Drüsenzellen auf (Abb. 1 a und 3). Es scheint uns, daß die große Anzahl der Kristalle in den Drüsenzellen von der großen Menge des in ihnen befindlichen Protoplasmas abhängig ist. Während der Virusvermehrung bildet sich nämlich das neue Viruseiweiß aus den normalen Eiweißverbindungen, die sich dabei in das Viruseiweiß umwandeln. Deshalb ist es leicht verständlich, daß in den protoplasmareichen Drüsenzellen eine größere Anzahl dieser Kristalle entstehen wird als in anderen, protoplasmaärmeren Zellen.

Sonst leiden verschiedene Varietäten von *Capsicum annuum* sehr häufig an der Tabakmosaikkrankheit. Neben der Virose, die von *Cucumis Virus 1* verursacht wird, ist das Tabakmosaik die häufigste Viruskkrankheit des Paprikas. Die letztere Krankheit ist auch von großem praktischem Interesse für die Kultur der Pflanze. Wenn die mit TMV infizierte Pflanze das

akute Krankheitsstadium überwindet, geht sie in das sogenannte chronische Stadium über, das bis zum Ende ihres Lebens andauert. Für das letzte Stadium ist es charakteristisch, daß sich dann die kranken Pflanzen von den gesunden nur ziemlich schwer unterscheiden lassen. Deshalb kann das Feststellen der Krankheit durch die Untersuchung der Anwesenheit der hexagonalen Kristalle sehr erleichtert werden, weil die Kristalle in der Drüsenepidermis sehr lange erhalten bleiben.

Wie aus dem Vorgehenden hervorgeht, ist das Tabakmosaik bei der Paprikapflanze ziemlich verbreitet. Dieser Umstand kann es erklären, daß Nestler (1906) in einer großen Anzahl von Paprikafrüchten Eiweißkristalle gefunden hat.

Zusammenfassung

Durch Beobachtungen an lebenden *Capsicum annuum*-Früchten wurde festgestellt, daß die von Nestler beschriebenen und von ihm als Baustoffe betrachteten Eiweißprismen keine normalen und regelmäßig vorkommenden Inhaltskörper sind. Von ungefähr hundert durchmusterten Paprikafrüchten hatten die Eiweißkristalle nur wenige, und zwar jene, die mit Tabakmosaikvirus (TMV) infiziert waren. Wir sind daher der Ansicht, daß auch Nestlers Kristalle durch das Tabakmosaik-Virus verursacht worden sind, d. h. durch eine Krankheit, an der *Capsicum annuum* gelegentlich sehr stark zu leiden hat. Daß die von Nestler beobachteten kristallinen Körper der Paprikafrüchte TMV-Kristalle sind, wird noch durch Beobachtungen unterstützt, daß Nestlers und die TMV-Kristalle in ihrer Form, in ihrer Verteilung im Fruchtgewebe und in ihrem Verhalten gegen verschiedenen Reagenzien übereinstimmen.

Literatur

- Bawden, F. C., 1950: Plant viruses and virus diseases. Waltham, Mass.
 Fedotina, V. L., 1957: Über die Natur kubischer Eiweißeinschlüsse in der Kartoffelknolle. Isvest. Akad. Nauk SSSR 1957, 114.
 Goldin, M. I., 1954 a: Viruseinschlüsse in der pflanzlichen Zelle (russisch). Moskva.
 — 1954 b: Zelleinschlüsse in *Melampyrum*. Dokl. Akad. Nauk SSSR 99, 855.
 — V. L. Fedotina, 1956: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Gewebe von *Impatiens balsamina* auf Anwesenheit virusähnlicher Partikeln. Dokl. Akad. Nauk SSSR 108, 953.
 Hölzl, J. und E. Bancher, 1958: Über die Eiweißkristalle von *Solanum tuberosum*. Österr. bot. Z. 105, 385.
 Iwanowski, D., 1903: Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. Z. Pflanzenkrankh. 13, 1.
 Köhler, E., und M. Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. In Sorauers Handb. d. Pflanzenkrankheiten, Berlin und Hamburg.
 Linsbauer, K., 1930: Die Epidermis. In: Handb. d. Pflanzenanatomie, Berlin
 McWhorter, F. P., und W. C. Price, 1949: Evidence that two different plant viruses can multiply simultaneously in the same cell. Science 109, 116.
 Meyer, A., 1920: Morphologische und physiologische Analyse der Zelle der Pflanzen und Tiere. Jena.

- Miličić, D., 1956: Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*. Protoplasma 47, 341.
 — 1960: Sind verschiedene Eiweißkristalle der Kakteen Viruskörper? Acta Bot. Croatica (in Druck).
 — M. Panjan, D. Bilanović und B. Katić, 1958: Viruskrankheit von *Alliaria officinalis*. Acta Bot. Croatica 17, 159.
 Moeller, J., 1905: Mikroskopie der Nahrungs- und Genußmittel. 2. Aufl. Berlin.
 Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Ber. deutsch. bot. Ges. 3, 195.
 — 1921: Mikrochemie der Pflanze. 2. Aufl. Jena.
 Nestler, A., 1906: Myelin- und Eiweißkristalle in der Frucht von *Capsicum annum* L. S. B. Wien. Akad. Wiss. math.-naturw. Kl., Abt. I, 115, 477.
 Reiter, L., 1956: Eiweißwürfel in *Solanum demissum*. Protoplasma 45, 633.
 — und F. Weber, 1960: Einschlusskörper in viruskranken *Hesperis*-Zellen. Protoplasma 51, 632.
 Roland, G., 1957: L'histotropisme des virus. Parasitica 13, 31.
 Rosenzopf, E., 1951: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlusskörper? Phyton 5, 95.
 Sheffield, F. M. L., 1931: The formation of intracellular inclusions in solanaceous hosts infected with *Aucuba* mosaic of tomato. Ann. appl. Biol. 18, 471.
 — 1939: Some effects of plant virus diseases on the cells of their hosts. J. Micr. Soc. 59, 149.
 — 1946: Preliminary studies in the electron microscope of some plant virus inclusion bodies. J. Micr. Soc. 66, 69.
 Steere, R. L., und R. C. Williams, 1953: Identification of cristalline inclusion bodies extracted intact from plant cells infected with tobacco mosaic virus. Amer. J. Bot. 40, 81.
 Thaler, I., 1954: Eiweißspindeln von *Valerianella*. Österr. bot. Z. 101, 566.
 — 1956: Proteinspindeln und anomale Zellwandbildung in der Epidermis viruskranker *Impatiens holstii*-Pflanzen. Protoplasma 46, 755.
 Weber, F., 1951: Trypanoplasten-Viruskörper von *Rhipsalis*. Phyton 5.
 — 1954: Sind alle Pflanzen mit Cytoplasma-Eiweißspindeln Virusträger? Phyton 5, 189.
 — und G. Kenda, 1952: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma 41, 111.
 — — und I. Thaler, 1952: Viruskörper in Kakteen-Zellen. Protoplasma 41, 277.
 Zimmermann, A., 1893: Über die Proteinkristalloide. Beitr. Morphol. u. Physiol. Pflanzen. 1. Tübingen.

Sammelreferat

Leafhopper-transmitted Plant Viruses

By

Karl Maramorosch

The Rockefeller Institute, New York

(Received June 10, 1960)

The subject of plant viruses transmitted by leafhoppers has been reviewed currently (Black 1959, Maramorosch 1959a) and the present discussion will be concerned primarily with the most recent advances in this field. In this connection it is a real pleasure to thank all those who so kindly communicated their results to me before publication.

Plant-pathogenic viruses transmitted by leafhoppers, first studied in Japan and in the United States, are now being investigated all over the world. With the discovery in 1953 of leafhopper-borne viruses in The Netherlands (de Fluiter et al. 1955, Maramorosch 1955a) studies of several viruses with biological cycles in insect vectors were started in Western Europe. Similar studies have been conducted for over 20 years in Russia and are now being carried out in other countries of Eastern Europe. My report will be biased because I am most familiar with work done in the U.S.A. and less familiar with work undertaken elsewhere. I shall discuss viruses according to the geographical regions and countries where they are being studied.

Work on leafhopper-transmitted viruses was hampered for many years by the fact that, with a few exceptions, these viruses could not be inoculated mechanically into plants. Their bioassay depended entirely on plant inoculations through the feeding of viruliferous insects. Serological methods were not available until very recently.

Purification and Serology. Some of the difficulties have been overcome by the pioneering work of Black (1955) and his co-workers who developed antisera to several leafhopper-borne viruses. An important step forward was made by Brakke's (1951) invention of the osmotic gradient centrifugation for virus purification. Brakke's technique, used later so successfully for purification of the poliomyelitis virus and now a standard technique in virology, was developed first for the purification of potato yellow dwarf virus and wound tumor virus. It resulted in the concentration and purification of several leafhopper-borne viruses (Black

1955, Brakke et al. 1951, 1954), permitting their study by electron microscopy and serology, and finally the first crystallization of one of these viruses. This crystallization was obtained with wound tumor virus by Vatter and Whitcomb at the University of Illinois. Techniques developed in related fields were very helpful in these advances. The use of adjuvants in plant virus serology is one example. Animal virologists began to use cesium chloride instead of sugar solutions for virus purification and it can be expected that plant virologists will also find cesium chloride very helpful for purification of plant viruses.

Brakke and Moorhead at the University of Nebraska are engaged in the study of serological relationships between several viruses. Particular emphasis is placed on developing new techniques for the study of cereal viruses.

Black's studies of wound tumor virus lead to the discovery of a soluble antigen, or so-called sub-virus. This appears not only in plants but also during the early stages of the intrinsic incubation period of wound tumor virus in its insect vector (Whitcomb and Black 1959). The increase in sub-virus titer precedes the appearance and increase of fully formed, infective virus. The discovery of the soluble antigen of wound tumor virus in both insect and plant supports the probability of the existence of an eclipse period, a possibility which was considered by Maramorosch in 1953 (1953b).

Virus Transmission and Multiplication. Vectorial and vectorless strains of potato yellow dwarf virus were first reported by Black in 1953. The virus, maintained for many years in plants by grafting, without access to the alternate, insect host, was reported to have lost its ability to be acquired and transmitted by its former vector. Recently Black, Wolcyz and Whitcomb (1958) obtained interesting results in a study of a vectorless strain of wound tumor virus. Their results suggest that the vectorless strain does not multiply in the leafhoppers and that it cannot be transmitted for this very reason. It becomes vectorless as the result of a host-induced modification and subsequent selection. The virus thus becomes phenotypically modified by its plant host in such a way that it loses its infectivity for leafhoppers, while remaining potentially infectious for plants. Its antigenicity remains intact or is only very slightly changed. On the basis of Black's findings with potato yellow dwarf and wound tumor viruses, one is led to speculate that certain viruses, now easily transmitted mechanically but not known to have efficient insect vectors, may have lost their ability to infect insects in the course of their evolution and as a consequence of their direct passage from plant to plant.

Recently Nagaraj (1959) in Black's laboratory found that the trans-ovarial transmission of wound tumor virus is a result of an inherited ability. It can differ in inbred lines of the leafhopper vector *Agalliopsis novella* from practically zero to over 80 per cent. The ability to transmit wound tumor virus is inherited by the same insects independently from the ability to transmit potato yellow dwarf virus.

Serological tests carried out by Black permit now for the first time measurement of virus increase during the incubation period in vectors. Thus an additional means is provided to prove that certain plant pathogenic viruses can multiply in arthropods.

Cross-Immunization in Vectors. Cross-protection by leaf-

hopper-borne viruses in leafhoppers was demonstrated for the first time by Kunkel in 1955. The presence of one strain (eastern) of aster yellows virus in the insects interfered with the transmission of another (California). The cross-protection was also demonstrated by Kunkel (1957) with individual leafhoppers. In these tests interference was reciprocal. In Maramorosch's (1958a) experiments with two strains of corn stunt virus, protection was unilateral, that is, it was afforded in one sequence of acquisition but not in the other. Freitag (1956) working with three different strains of aster yellows virus, found protection in some but not in other sequences. It is important in this connection that cross-protection tests between strains of viruses or between viruses of unknown relationship be carried out in all possible orders of acquisition, and with adequate time for the establishing of the infection in the vector. As pointed out by Black (1959), this cross-immunization of insects provided a means not previously available for testing relationships between viruses.

Site of Virus Multiplication. The site of plant virus multiplication is still unknown. Since 1956 Littau and Maramorosch have studied the cytological changes that occur in aster leafhoppers carrying aster yellows virus (1956, 1958, and in press). It has been established that changes occur in male vectors 18 to 28 days after virus acquisition through feeding or injections. Although these changes are often very striking, no other deleterious effect on viruliferous males has been detected so far. The hypothesis (Black 1959) that these changes indicate the site of virus multiplication remains to be proved.

Studies are now in progress in Black's laboratory with fluorescent antibody, to localize the site of viral multiplication in leafhoppers.

Tissue Culture. Attempts to study leafhopper-borne viruses on a cellular level began a few years ago, in collaboration with Nickell, Grace and Littau (Maramorosch et al. 1958). These studies are being continued by Grace in Australia and by Bergmann in our laboratories at the Rockefeller Institute. It has not yet been possible to grow leafhopper tissues in a way similar to *Lepidoptera* ovary sheath tissue. On the other hand, an ingenious technique developed recently by Bergmann (1959a, b) permits the cultivation of large numbers of cell clones derived from single cells. This technique lends itself to the study of virus-free and virus-infected cells and clones in tissue culture.

Diseases of Vectors. Two instances of undisputed diseases of vectors due to plant pathogenic viruses were reported within the past two years.

The first was described in detail by Jensen (1958, 1959a, b). Vectors of the peach yellow leafroll strain of western X-disease virus were found to live only half as long as virus-free individuals of the same species, i. e. *Callodonus montanus*. Jensen (personal communication) also found a lethal effect of virus on embryos of leafhoppers; the progeny obtained from viruliferous females was much smaller than from virus-free females. So far no histological studies have been published and no mechanical inoculation of insects with hemolymph from viruliferous individuals has been carried out. If the latter should be successful and if it should result in increased mortality, this would eliminate the possibility that the shortened life was caused by toxic substances acquired from virus-infected plants. Even now, the evidence strongly supports the virus as the lethal

factor because of those insects that fed on diseased plants only the active transmitters died earlier, while nontransmitting insects lived as long as noninfected controls.

Slykhuis and Watson (1958) described European wheat striate mosaic virus. This leafhopper-transmitted virus of wheat in England is similar to the wheat striate mosaic of South Dakota (Slykhuis 1953). According to Slykhuis (1958) wheat striate mosaic occurs in several parts of Europe and the same virus may even be responsible for the wheat mosaic ("Zakuklivanie") transmitted in Russia by *Delphacodes striatella* Fallen (Zazhurilo and Sitnikova 1939, Sukhov and Petlyuk 1940). Lindsten (1959) reports its occurrence in Sweden. Recently Watson and Sinha (1959) described their extensive studies on strains of *Delphacodes pallucida* Fabricius. The strains of leafhoppers in England differed in their efficiency to transmit the virus and also in the degree in which they were affected by the virus. If the mothers acquired virus at the time of mating, nearly all their nymphs were noninfective and remained so as long as they were tested. This finding would be expected in view of the comparatively long incubation period (14 days) of the virus in the vector. On the other hand, some nymphs could transmit virus almost immediately after hatching if their mothers were actively transmitting at the time the eggs were deposited, thus resembling nymphs of *Delphacodes striatella* infected with rice stripe virus (Yamada and Yamamoto 1956). The embryos often died at a late stage of development and only about one-third as many nymphs were obtained from infective mothers as from virus-free females. Wheat striate mosaic virus appears to be a true pathogen of the insect as well as of the plant. Watson did not succeed in carrying this virus mechanically to the insects. A preliminary attempt by Watson and me in 1957 failed when all injected insects prematurely died. If mechanical inoculations could be improved sufficiently to insure the survival of the leafhoppers, this method would lend itself to the demonstration of virus in prematurely dying embryos, as was done by Malogolovkin with *Drosophila* (1957).

Stolbur and Related Viruses. Interrelationships of yellows-type viruses are now being studied intensively in Czechoslovakia. In Prague, Blattny and co-workers (1958) have studied virus transmission by *Hyalestes obsoletus* and by *Aphrodes bicinctus*. In Bratislava, similar studies have been made at the Institute of Virology by Valenta and his staff. In addition, Valenta has studied interrelationships of several European as well as American viruses (1959 a, b). For the first time viruses from the two hemispheres have been compared *in vivo* in susceptible plants. Valenta's results indicate that cross-protection occurs between German and Canadian types of potato witches' broom virus. Stolbur virus, on the other hand, suppressed all other viruses tested, including Crimean yellows, while Crimean yellows suppressed and eventually replaced German and Canadian witches' broom viruses. By suitable arrangement of the viruses in cross-protection tests, it was possible to establish a certain gradient in mutual interaction of these yellows viruses. Stolbur could be called the "strongest" and Czechoslovak type 2 potato witches' broom virus the weakest of those tested so far. Valenta's results may indicate that the group of yellows viruses actually represents a group of related viruses and that their position in the "gradient of mutual interaction"—should

its existence be confirmed—reflects the degree of their mutual interrelationship.

Electron microscopy of aster yellows virus. Attempts to study the morphology of aster yellows virus were made by Protzenko in 1958 in Moscow. Crude sap was taken from several species of plants infected in nature by yellows-type viruses, all believed to be aster yellows. Droplets of the sap were placed on the screen, shadowed and photographed. Whether the published pictures represent aster yellows virus can not be ascertained because no correlation was made with infectivity and the preparations were not purified. The number of particles and their uniformity varied; nevertheless, a round particle of 37 millimicrons was stated to be characteristic of aster yellows virus. No such particles were said to be seen in the virus-free controls.

Phyllody of clover. Phyllody of clover, found a few years ago in England by Frazier and Posnette (1957) and also studied by Valenta in Czechoslovakia, has been reported from Russia. Its transmission by *Hyalestes obsoletus* was established by G. M. Razviaskina, who found diseased clover plants in 1957 in the Moscow region.

In England A. F. Posnette (personal communication) is working with five different leafhopper-transmitted viruses: green petal, clover witches' broom, *Rubus* stunt, aster yellows and stolbur. The clover witches' broom virus causes proliferation on *Vinca* but no virescence of the flowers. The latent period of the green petal virus in the vector is usually about 30–40 days and in the plant even longer. *Vinca* plants held at 38–40° C for 3 weeks have not been cured. Valenta (1959 c) made an extensive study of experimental heat inactivation of some European yellows viruses *in vivo* and his results permit a comparison of heat lability in this group of viruses.

Aster Yellows Strains. In 1958 Kochmann and Ksiazek in Poland (personal communication) found a serious outbreak of aster yellows in onions. The virus was transmitted in the field and in the laboratory by *Macrosteles laevis* Rib. I was able to establish that this European strain of aster yellows resembles closely the eastern American strain, but slight symptomatic differences in infected *Nicotiana rustica* and *Callistephus chinensis* were noticed. The European virus is readily transmitted by the American aster leafhopper *Macrosteles fascifrons* Stål. The incubation period of the European virus strain was compared with that of the eastern American and a Canadian celery-infecting virus strain. At 25° C no significant differences were found in the length of incubation. However, it was noticed that the efficiency of *M. fascifrons* in transmitting the European and eastern American strain was higher than its efficiency in transmitting the Canadian strain.

Gibberellic Acid Treatments. Two years ago I reported that treatments of certain virus-stunted plants with gibberellic acid reversed the stunting caused by the yellows diseases (Maramorosch 1959 d). However, plants remained diseased and only their size changed. These findings stimulated further work on gibberellic acid with virus diseased plants. Yerkes (1959) in Mexico treated stunted beans but obtained no improvement when the application was made after the disease has progressed in the bean plants. An indication of a practical application of such treatments comes from the Philippines where, according to

McWhorter (1959) gibberellic acid has been applied by Mercado in a plantation near Naga City to coconut palms affected with cadang-cadang disease.

Disease Symptoms Induced by Feeding of Leafhoppers. A leafhopper-borne disease, resembling the Australian Wallaby-Ear disease, was found in our laboratory in corn plants exposed to *Dalbulus elimatus*. Attempts to transmit virus by means of other insects from a *D. elimatus* colony were unsuccessful. The swellings on leaves eventually disappeared and the plants recovered. The observation of this ephemeral disease (Maramorosch 1959b) became of interest when Day and Grylls (personal communication) in Australia noticed that all *Cicadulina bimaculata* leafhoppers, collected in different localities in Queensland, invariably induced Wallaby-Ear by their feeding. All *C. bimaculata* progeny were also found to induce the typical swellings. In the typical Wallaby-Ear disease reportedly swellings tend to disappear. It seems likely that Wallaby-Ear, as well as the ephemeral disease found in our own tests, is caused by insect toxins and not by a virus.

Beneficial Effect on Insects. In the course of an investigation of the fate of viruses acquired by nonvector insects (Maramorosch 1958b), corn leafhoppers were given access to aster plants with eastern aster yellows virus. The corn leafhoppers were not rendered infective but they were found changed in an unexpected way. After they acquired virus by feeding, they could survive on diseased as well as on healthy aster plants, while ordinarily corn leafhoppers died on healthy asters. It was further found that the acquisition of aster yellows virus by nymphal instars that later molted on corn conditioned the adults so they were able to live on asters. The progeny of conditioned insects could not live on healthy asters unless they in turn acquired aster yellows virus. The acquisition of virus from diseased aster plants permitted conditioned leafhoppers to feed not only on healthy asters but also on healthy carrots, although healthy carrot plants are as unsuitable for corn leafhoppers as healthy asters (Maramorosch 1959c). When conditioned insects were maintained at 36°C for 8 days, they survived well on maize plants; the aster yellows virus could no longer be recovered from their blood and the conditioning effect was destroyed so that they no longer survived when fed on healthy aster plants. A celery-infecting strain of aster yellows from Canada did not condition corn leafhoppers, however. Attempts to condition leafhoppers by needle-inoculation with aster yellows virus were not successful. The conditioning seems to benefit the corn leafhopper because it enlarges its otherwise very restricted diet; it might insure survival in nature in circumstances in which maize is not available, for instance, between harvests.

Leafhopper-Borne Viruses in Australia. In Australia, Hutton and Grylls described in 1956 a virus disease of subtropical legumes called "Legume Little Leaf". The causative virus is transmitted by *Orosius argentatus*, known also as vector of lucerne witches' broom virus. It now appears likely that the virus is a variant of that which causes witches' broom. The disease is widespread among legumes in the tropical and subtropical areas of Australia, where it has been present for a number of years. Its occurrence hampers seriously the establishment of new legumes in tropical and subtropical Australia.

Rugose leaf curl virus, described by Grylls in 1954, was found to pass transovarially to a high percentage of the progeny of its leafhopper vector *Austroagallia torrida*. The disease caused by this virus causes serious losses, particularly in pastures in Queensland.

Pseudo-Curly Top. The so-called pseudo-curly top virus of Florida, discovered by Stoner (1950) and by Giddings et al. in 1951, is not leafhopper-borne but treehopper-borne. It is transmitted by a species of *Micrutalis* (Simons and Coe 1958). The virus is not a strain of curly top virus, as I was able to ascertain in the spring of 1959 when I observed the disease in Florida. It is not transmitted by *Circulifer tenellus* and the membracid vector is unable to transmit California curly top virus. The striking resemblance of the diseases curly top and pseudo-curly top is, so far as is known, limited to tomato plants. In other hosts the symptoms might be quite different.

Recent Work in Japan. a) **Rice Dwarf.** Eight leafhopper-borne viruses have been recognized in Japan; four of these cause diseases of the rice plant.

Rice dwarf virus has been known to be transmitted by *Nephotettix cincticeps* since 1908. In 1934 Fukushima demonstrated that not all individuals of this leafhopper species transmit the virus. Recently Shinkai (1955) found that leafhoppers captured in some localities were efficient vectors, while insects from other localities lacked the ability to transmit. This finding was confirmed by Fukushima and Kimura (1959).

Twenty-seven years ago Fukushima (1940) obtained evidence that the virus passes transovarially to the progeny, which enabled him to demonstrate virus multiplication in the vector by means of passages through many generations. In 1958 Shinkai discovered transovarial passage of this virus in another vector, *Deltocephalus dorsalis*.

Fukushima and Kimura (1958, 1959) transmitted the virus mechanically to *N. cincticeps* by injections and found that the concentration of the virus in insects and their eggs is higher than in rice plants. They also attempted to cultivate the virus on the chorioallantoic membrane of embryonated chick eggs but were unable to recover the virus.

Fukushima, Shikata and Nemoto (1958) studied the morphology of the virus in thin sections of leaves and described it as possessing an outer membrane and a central darker body, resembling somewhat certain insect viruses (Fukushima and Shikata 1959).

b) **Rice Stripe.** Rice stripe virus was shown by Kuribayashi in 1931 to be transmitted by *Delphacodes striatella*. In recent years Shinkai (1955) and Yamada and Yamamoto (1955, 1956) found that this virus also passes readily through the egg of infective females to their progeny. Shinkai carried the virus through forty generations; his experiment lasted 5 years with no indication of a decline in virus titer. Yamada and Yamamoto carried the virus through twenty-four passages. The leafhoppers varied genetically in their ability to transmit. The greatest proportion of infective progeny occurred among descendants of the active, or susceptible, insects while the least proportion of infective progeny was found among the progeny from inactive, or nonsusceptible, insects. Crosses between the two resulted in an intermediate proportion of transmitting insects. Nymphs from females which had just acquired virus before ovipositing required an incubation period before transmitting,

while those from infective females could transmit immediately after hatching. As in the case of rice stunt virus and clover club leaf virus, the virus did not pass through the sperm and almost all progeny received the virus.

c) Rice Yellow. According to information received from Professor T. Fukushi, rice yellow virus was found to be transmitted by *Nephotettix cincticeps* in 1943 at the Kochi Agricultural Experiment Station. After the war, Enjoji in 1948 and Iida and Shinkai (1950) confirmed this finding. In 1959 Shinkai found that *N. apicalis* also transmits this virus.

d) Rice Streak. In 1952 Kuribayashi and Shinkai described rice streak as distinct from rice dwarf, for which the former was mistaken for many years. Although the stunting in both diseases is similar, the diseases differ in the swellings of the veins. Rice streak virus is transmitted by *Delphacodes striatella*. Recently it was reported that barley, wheat and corn are also natural hosts in Japan.

e) Northern Cereal Mosaic. Fifteen years ago Ito and Fukushi (1944) described the transmission of northern cereal mosaic virus, but their papers were written in Japanese and escaped the attention of workers outside Japan. The disease occurs in oats, barley and rye, while rice, corn and sorghum could not be infected experimentally. Among wild grasses several were found susceptible. The disease shows striking similarities to "Zakuklivanie" of oats in Russia. The vector *Delphacodes striatella* transmitted after an incubation period of 9-21 days, and sometimes an acquisition feeding period of 5-10 minutes was sufficient. Disease symptoms in barley appeared after 4-14 days, with an average of 8 days.

Three other leafhopper-borne viruses are of minor importance in Japan: aster yellows virus (Fukushi and Nemoto 1953) and potato witches' broom (Fukushi et al. 1955a, b), transmitted by the same vector *Ophiola flabopicta*, and mulberry dwarf virus, transmitted by *Eutettix discigutta*.

Proposal for an International Virus-Vector Laboratory. Although virus-vector relationships are of great theoretical and practical interest to workers all over the world, the study of viruses and vectors is often hampered by the lack of a properly isolated and quarantined laboratory. I proposed the creation of an international laboratory for the study of viruses and vectors at the 4th International Congress for Crop Protection in 1957 (Maramorosch 1957) and the proposal was accepted unanimously by nearly 300 virus workers and drafted as one of the resolutions of the Congress. However, no steps were taken towards a realization of this proposal. Therefore I wish to repeat my plea and propose again the establishment of an international laboratory, preferably on a small island in the Atlantic Ocean, under the sponsorship of the United Nations. Such a laboratory would require only a small permanent administrative staff, and adequate safeguards for insect vector work in greenhouses and perhaps screened outdoor plots. The scientific personnel could come from all interested countries and institutions for periods ranging from one month to one year. Such a laboratory would serve a very useful purpose by helping in the solution of numerous pertinent questions of fundamental and practical importance.

References

- Bergmann, L., 1959: *Nature* 184, 648—649.
— 1960: *J. Gen. Physiol.* 43, 841—851.
Black, L. M., 1953: *Phytopath.* 43, 9—10.
— 1955: *Phytopath.* 45, 208—216.
— 1959: In: *The Virus*, vol. II. New York.
— S. Wolcyrz, and R. F. Whitcomb, 1958: Abstract, 7th Internat. Congr. Microbiol.
Blattny, C., 1958: In: *Stolbur and Similar Virus Diseases Causing Seedlessness of Plants*. Proc. Sci. Conf. on Stolbur. Spaldon and Blattny, Eds. Slovak. Acad. Sci., Bratislava. (In Czech., with English summary.)
Brakke, M. K., 1951: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1847.
— L. M. Black, and R. W. G. Wyckoff, 1951: *Am. J. Bot.* 38, 332.
— A. E. Vatter, and L. M. Black, 1954: *Brookhaven Symposia in Biology* 6, 137—156.
de Fluiter, H. J., H. H. Evenhuis, and F. A. van der Meer, 1955: Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, p. 84.
Frazier, N. W., and A. F. Posnette, 1957: *Ann. Appl. Biol.* 45, 580—588.
Freitag, J. H., 1956: *Phytopath.* 46, 73.
Fukushi, T., 1934: *J. Fac. Agr., Hokkaido Imp. Univ.* 37, 2—41.
— 1940: *J. Fac. Agr., Hokkaido Imp. Univ.* 37, 41—164.
— et al., 1955 a: *Proc. Jap. Acad.* 31, 234—236.
— et al., 1955 b: *Mem. Fac. Agr., Hokkaido Imp. Univ.* 2, 52—61. (In Japanese.)
— and M. Nemoto, 1953: *Virus* 3, 208. (Abstract.)
— and I. Kimura, 1958: *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* (Abstract.)
— and I. Kimura, 1959: *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* (Abstract.)
— E. Shikata, and M. Nemoto, 1958: *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* (Abstract.)
Giddings, N. J., C. W. Bennett, and A. L. Harrison, 1951: *Phytopath.* 41, 415—417.
Grylls, N. E., 1954: *Austral. J. Biol. Sci.* 7, 47—58.
Hutton, E. M., and N. E. Grylls, 1956: *Austral. J. Agr. Res.* 7, 85—97.
Iida, T., and A. Shinkai, 1950: *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* (Abstract.)
Ito, S., and T. Fukushi, 1944: *J. Sapporo Soc. Agric. Forest.* 36(3), 62—89. (In Japanese.)
— — 1944: *J. Sapporo Soc. Agric. Forest.* 36(4), 65—88. (In Japanese.)
Jensen, D. D., 1958: *Phytopath.* 48, 394.
— 1959 a: *Virology* 8, 164—175.
— 1959 b: *Pan-Pacific Entomologist* 35, 65—82.
Kunkel, L. O., 1955: *Advances in Virus Research* 3, 251—273.
— 1957: *Science* 126, 1233.
Kuribayashi, K., and A. Shinkai, 1952: *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* (Abstract.)
Lindsten, K., 1959: *Phytopath. Ztschr.* 35, 420—428.
Littau, V. C., and K. Maramorosch, 1956: *Virology* 2, 128—130.
— — 1958: *Phytopathology* 48, 263.
— — 1960: *Virology* 10, 483—500.
McWhorter, F. P., 1959: *Araneta J. Agric.* 6, 13—23.
Malogolovkin, C., and D. F. Poulson, 1957: *Science* 126, 32.
Maramorosch, K., 1953 a: *Plant Disease Reporter* 37, 612—613.
— 1953 b: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18, 51—54.

- Maramorosch, K., 1958a: *Virology* 6, 448—459.
— 1958b: *Tijdschr. o. Plantenziekten* 64, 583—591.
— 1959a: Volume in *Homage to Savulescu* (Ed. Rumanian Acad.), pp. 421—442.
— 1959b: *Ent. Exp. and Appl.* 2, 169—170.
— 1959c: *Phytopathology* 49, 545.
— 1959d: *Proc. 4th Internat. Congr. Prot. Hamburg 1957*. Vol. 1, p. 271—272.
— L. G. Nickell, V. C. Littau, and T. D. C. Grace, 1958: *Anat. Record* 131, 579.
Nagaraj, A. N., 1959: *Phytopathology* 49, 546—547.
Protsenko, A. E., 1958: *Mikrobiologiya* (USSR) 27, 128—130.
Razviaskina, G. M., 1959: *J. Zool.* 38, 494—495. (In Russian.)
Resolutions of the IV. Congress for Crop Protection, Hamburg 1957. *Nachrichtenblatt Deutsch. Pflanzenschutzdienstes* 9(12): 4, 1957.
Shinkai, A., 1955: *Ann. Rept., Kanto and Tosan Phytopath. Entom. Soc.* 1955: 5—6. (In Japanese.)
Simons, J. N., and D. M. Coe, 1958: *Virology* 6, 43—48.
Slykhuys, J. T., 1955: *Phytopathology* 45, 537—540.
— 1958: *Food and Agric. Organization U. N., FAO Plant Prot. Bull.* 6, 129—134.
— and M. A. Watson, 1958: *Ann. Appl. Biol.* 46, 542—555.
Stoner, W. N., 1950: *Florida Exp. Sta. Ann. Rept.*, p. 206.
Sukhov, K. S., and P. T. Petlyuk, 1940: *C. R. Acad. Sci. USSR* 26, 485—486.
Valenta, V., 1959a: *Acta Virologica* 3, 65—72.
— 1959b: *Acta Virologica* 3, 145—152.
— 1959c: *Biologia* 14, 146—149.
Vatter, A. E., and R. F. Whitcomb: To be published.
Watson, M. A., and R. C. Sinha, 1959: *Virology* 8, 139—163.
Whitcomb, R. F., and L. M. Black, 1959: *Phytopathology* 49, 554.
Yamada, W., and Y. Yamamoto, 1955: *Okayama Pref. Agr. Exp. Sta. Special Bull.* 52, 93—112. (In Japanese.)
— — 1956: *Okayama Pref. Agr. Exp. Sta. Special Bull.* 55, 35—56. (In Japanese.)
Yerkes, W. D. Jr., 1959: *Phytopathology* 49, 555.
Zazhurilo, V. K., and G. M. Sitnikova, 1959: *C. R. Acad. Sci. USSR* 25, 798.

Referate

Handbuch der Pflanzenphysiologie. Herausgegeben von W. Ruhland †. Bd. XVII: Physiologie der Bewegungen. Teil 1: Bewegungen durch Einflüsse mechanischer und elektrischer Natur sowie durch Strahlungen. Redig. v. E. Bünning. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1959. Mit 513 Abb., XVI, 716 S. Ganzl. DM 216.—. (Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches Subskriptions-Preis DM 172.80.)

Die Bearbeitung der „Physiologie der Bewegungen“ ist in 2 Bänden vorgesehen, von denen Teil 1 „Bewegungen durch Einflüsse mechanischer und elektrischer Natur sowie durch Strahlungen“ erschienen ist. Als Bandredakteur zeichnet E. Bünning. Sein Name ist seit vielen Jahren mit richtunggebenden Originalarbeiten und großen zusammenfassenden Darstellungen aus dem Gebiet der Bewegungen und Bewegungsrhythmik der Pflanzen verbunden. Die Einführung sowie die Abschnitte über allgemeine Gesetze und Phänomene der pflanzlichen Bewegungsphysiologie, über die Wirkung von Wundreizen, die seismonastischen, thigmonastischen und thigmotropischen Reaktionen, über Phototropismus und Photonastie der Laubblätter und das umfangreiche Kapitel über tagesperiodische Bewegungen stammen aus seiner Feder.

Auch die übrigen elf Autoren des vorliegenden Bandes verfügen auf den Gebieten der von ihnen bearbeiteten Abschnitte über reiche Forschungserfahrung, so daß schon die Nennung ihrer Namen für die Güte der einzelnen Beiträge bürgen mag. Von K. Umrath bearbeitet wurde das Allgemeine über den Erregungsvorgang in der Pflanze, die möglichen Mechanismen von Krümmungsbewegungen, die Abschnitte über die Wirkung elektrischer Reize auf die Zelle, über Galvanotaxis und die Reizleitung bei der Seimonastie. Elektronastie und Elektrotropismus wurden von A. B. Schrank dargestellt. Von H. v. Güttenberg stammen die Beiträge zur physiologischen Anatomie seimonastisch reaktionsfähiger Organe und der Spaltöffnungen, von Bailland die über die physiologische Anatomie der thigmotropischen und thigmonastischen Organe. Chloroplastenbewegung, Phototaxis der Algen und Photosynthese wurden von W. Haupt, die Phototaxis der Purpurbakterien von R. K. Clayton bearbeitet. Die Rolle von Licht und CO_2 in der Bewegung der Stomata ist in einem umfassenden Beitrag von O. V. S. Heath behandelt, dem sich ein kurzer Beitrag über sonstige Reizreaktionen der Spaltöffnungen von M. G. Stälfelt anschließt. In die Bearbeitung des Kapitels Phototropismus und Photonastie teilten sich schließlich L. Brauner (Phototropismus und Photonastie der Laubblätter), A. W. Galston (Phototropismus von Stamm, Wurzeln und Koleoptilen) und G. H. Banbury (Phototropismus der niederen Pflanzen).

Der Band fügt sich nach Inhalt und Ausstattung würdig in die bisher erschienene Reihe des Handbuches der Pflanzenphysiologie ein.

R. Biebl (Wien).

Homma, H.: Das Formproblem in der Biologie. Mit 2 Abb. V, 50. S.
Wien: Springer-Verlag. 1958. Steif geh. S 30.—, DM 5.—, sfr. 5.10, \$ 1.20,
£ -/8/6.

Hommas Arbeit stellt offenbar einen Versuch dar, dem Formproblem auf Grund der Meinung, daß „die Form konkreter Dinge etwas Abstraktes, nämlich eine topische Relation von Teilen“ ist, unter willkürlicher Auswahl von richtigen und falschen oder mißverstandenen, der Literatur entnommenen Belegen kompilatorisch näherzukommen. Zur Begründung dieser These wird darauf hingewiesen, daß das Erfassen der Form konkreter organischer Gebilde mit Hilfe der zahlenmäßig feststellbaren Anordnung von außerhalb der molekularen Dimensionen liegenden Teilchen in ähnlicher Weise möglich sein müsse, wie das für geometrische Körper mittels der Zahlenverhältnisse des Pascalschen Dreiecks geschieht. Der Verfasser, der sich offenbar der Weismannschen Lehre von der Kontinuität des Keimplasmas in dogmatischer Einsichtigkeit verschrieben hat, entwickelt, von obiger Vorstellung ausgehend, sachlich wie logisch sonderbar anmutende Schlußfolgerungen, die letzten Endes darauf hinauslaufen, die am Aufbau der Organismen teilnehmenden Zellen in sechs, sich graduell hinsichtlich ihrer prospektiven Potenz unterscheidenden Typen zu scheiden, wobei nicht nur die qualitative, sondern auch die quantitative Leistung des Materials entscheidend sein soll. Dabei wird eine neue Nomenklatur verwendet, die bekannte Begriff durch fremde, wie etwa prospektive Potenz durch „formative potentielle Energie“ ersetzt, ohne gleichzeitig präzise Definition für neue Termini wie „f. A.“ (formative Arbeit) oder „f. E.“ zu geben. — Bisher war der Begriff Totipotenz für jeden Entwicklungsphysiologen absolut eindeutig; er galt sowohl für das zur Selbstdifferenzierung befähigte Keimzellenmaterial als auch für alle meristematischen, bereits differenzierten oder embryonal verbliebenen oder des differenzierten somatischen Elemente, die ihre Totipotenz allerdings nur im Verband mit anderen Zellen bzw. in einem morphogenetischen Feld zu manifestieren vermögen. Totipotenz ist dabei der Ausdruck für die Fähigkeit jede im Rahmen des jeweiligen Organisationstyps überhaupt mögliche Differenzierungsrichtung, falls dazu determiniert, einzuschlagen. Eine „Plusquamtotipotenz“ im Sinne Hommas ist demnach ein Widerspruch in sich, denn mehr als totipotent kann eine Zelle doch gar nicht sein, andernfalls war ihre postulierte Totipotenz eine Fehlmeldung. Die „plusquamtotipotenten Zygoten“ und „plusquamtotipotenten Somazellen“ nur deshalb so zu nennen, weil aus ihnen später totipotente Gameten und Somazellen in mehreren Generationen hervorgehen, erscheint kaum vertretbar, denn warum sollten totipotente Zellen ihre Totipotenz denn nicht unvermindert weitergeben? Für die interstitiellen Zellen der Hydroiden und für die Stammzellen fissiparer Turbellarien und Anneliden trifft das doch durch Monate oder Jahre hindurch zu. Nur die vorgefaßte Meinung von einer ständigen Abnahme der „formativen potentiellen Energie“ konnte den Verfasser überhaupt zur Annahme einer solchen „Plusquamtotipotenz“ führen. Da er weder die zoologische noch die botanische Literatur ausreichend beherrscht, um ein so komplexes Problem wie die Formbildung überblicken zu können, ergeben sich dann Fehlbehauptungen, die die positiven Gedanken in der Arbeit weitgehend überschatten. So erblickt er u. a. den Sinn der Befruchtung in der „Schaffung eines genügenden formativen Kapitals zur Realisierung von Individuen“, eine Behauptung, die mit der der Normalentwicklung durchwegs gleichwertigen formativen Leistung bei haploider wie diploider, obligatorischer wie fakultativer Parthenogenese absolut unvereinbar ist. Durch die von Homma versuchte Bagatellisierung der Parthenogenese unter Berücksichtigung nur derjenigen Fälle, die eventuell für eine verminderte „f. E.“ sprechen könnten, wird obiger Tatbestand höchstens für Nichtfachleute aus

der Welt geschafft. Vielleicht ist es dem Verfasser tatsächlich unbekannt, daß haploide Parthenogenese außer bei der „seit Jahrhunderten als Symbol der Faulheit, der Inaktivität“ geltenden Drohne auch bei den keineswegs inaktiven Rotatorien, bei Milben, bei *Icerya* und den Trialeurodiden vorkommt und daß obligatorische diploide Parthenogenese über die in der Arbeit angeführten Beispiele hinaus, bei zahlreichen Phanerogamen, bei bestimmten Euphyllipodenrassen, Stabeuschrecken, Wanzen, diversen Hautflüglern und Schmetterlingen, fakultative bei Krebsen, Tausendfüßern (*Polyxenus*), Käfern, ja sogar, als Merospermie, beim Goldfisch nachgewiesen wurde. In allen diesen Fällen ist die formative Leistung der jeweiligen sich parthenogenetisch entwickelnden Eizelle identisch mit derjenigen nach normaler Befruchtung. Entgleisungen wie die, das unbefruchtete Bienenai als „Mikrospore nach der botanischen Nomenklatur“ zu bezeichnen und hinzuzufügen, die „Torpiditytät der Drohne erleichtert die Analogisierung mit pflanzlichen Gametophyten“ sollten in einer durch Druck veröffentlichten Arbeit unmöglich sein. Das Volumen oder das Gewicht des Organismus und seiner vegetativen Deszendenten als ein Kriterium für die morphogenetische Leistung eines Keimes in Anspruch zu nehmen und daraus etwa eine „gleiche Menge formativer potentieller Energie“ bei Eiche und Heidelbeere, *Echinococcus* und *Taenia saginata* anzunehmen, erscheint genau so abwegig wie der in krasser Unkenntnis der Nematodenanatomie unternommene Versuch, eine kausale Beziehung zwischen der großen Eiproduktion eines Spulwurms und der Zellkonstanz dieses Tieres zu konstruieren, ist Zellkonstanz doch gleichermaßen bei freilebenden Nematoden mit ihrer geringen Eizahl vorhanden! Für den Anatomen neu ist die Behauptung, daß die Umbildung der Müllerschen Gänge zu Fruchthältern eine Erwerbung der Säuger ist ... hat der Verfasser noch niemals etwas von den Uteri der viviparen Haie und den Dottersackplazenten ihrer Föten, von graviden Salamanderuteri, von viviparen Schlangen und Eidechsen u. ä. gehört? In allen diesen Fällen sind es doch die Müllerschen Gänge, welche genau so wie bei den Säugern zu Fruchthältern erweitert sind, und bei nicht wenigen unter ihnen an der Ernährung des Embryos teilhaben. Bedenklich, da den Nichtspezialisten beeindruckend, erscheint die Behauptung von der Totipotenz isolierter einkerniger Fragmente acöler Turbellarien. H o m m a behauptet, daß ein dem Zentralparenchym entnommenes „Klumpchen Symplasma mit einem einzigen Kern“ sich zu einem vollständigen neuen Individuum mit Geschlechtszellen zu entwickeln vermag. „Die Totipotenz eines zellwertigen Somaklumpchens ist damit gesichert.“ Diese Behauptung ist eine glatte Erfindung: Steinböck, der a. o. O. zitiert wird, hat etwas Derartiges niemals behauptet. Zwar ist es denkbar, ein einkerniges Explantat eines Acölen oder eines anderen Plathelminthen in einem geeigneten Kulturmedium zur Weiterentwicklung zu bringen, genauso wie man das mit Epidermisfragmenten des Begonienblattes tatsächlich kann. Im Falle der Begonie kommt es lediglich zu desorganisierter Gewebebildung, bei Acölen dürfte der Versuch ist noch nie geglückt, Entsprechendes zu erwarten sein. Die H o m m a offenbar vorschwebende Selbstdifferenzierung isolierter somatischer Zellen findet, von der Apogamie bei *Marsilia* und *Antennaria* abgesehen, nirgends statt. Gegenüber den angeführten sachlichen Fehlern der Arbeit treten gelegentlich systematische oder sprachliche Entgleisungen wie „es steigt die Leistung von der Klasse der Fische bis zu der der Wirbeltiere“ oder „die eineiige Polyembryonie der Säuger und vielleicht der Wirbeltiere“ ganz zurück. Alles in allem ein Ergebnis oberflächlicher Meditationen, das vor einer Veröffentlichung hätte kritisch und sachkundig überarbeitet werden müssen.

E. Reisinger (Graz).

Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung. Herausgegeben von L. V. Heilbrunn und F. Weber. Band VI: Kern- und Zellteilung. E. Amitose 1: Die Amitose der tierischen und menschlichen Zelle. Von Otto Bucher. Mit 56 Textabb., IV, 159 S. Wien: Springer-Verlag. 1959. S 360.—, DM 60.—, sfr. 61.40, \$ 14.30, £ 5/2/—.

Der Beitrag entspricht einem Bedürfnis der zytologischen Forschung. Bucher behandelt in Kapiteln: die Geschichte; die Definition des Begriffes; Vorkommen und Schwierigkeiten der Diagnose; den Unterschied zu Kernlappung und Kernfragmentierung; die Meroamitose (Thomas); Karyonomie (Feyrter); Endozytogenese (Collin); auch Endomitose (Geitler) und Pseudoamitose (Politzer) sind behandelt. Besondere Kapitel betreffen den Ablauf der „echten“ Amitose und die Umstände, die dazu führen. Tabellarisch finden sich Zusammenfassungen der Literatur über Amitose in der Zellkultur und über die beschriebenen Fundorte amitotischer Teilungsbilder.

Der aufmerksame Leser des Beitrages möchte bemerken, daß nicht immer mit genügender Schärfe die Beobachtungen an fixierten Präparaten mit gedanklicher Rekonstruktion eines Vorganges aus Aneinanderreihung von Zustandsbildern einerseits und Lebendbeobachtung andererseits auseinandergehalten werden (auch in Zellkulturen). Wer sich mit Zeitrasteraufnahmen von Zellen lebender Kulturen und mit dem Studium gleicher Kulturen im fixierten Zustand beschäftigte, wird wissen, wie trügerisch fixiertes Material bzw. Rückschlüsse auf Lebensvorgänge gerade für die Amitose sind. Es scheint auch fraglich, ob man Beweise für echte amitotische Zell- (nicht nur Kern-)teilungen im symplasmatischen Verband von Bindegewebszellen finden kann. Das Problem der Kernfragmentierung behandelt Bucher nur aus einem Teil der Literatur; andere Autoren tut er in überraschender Weise ab, ohne deren Ansicht näher zu prüfen, nämlich: die weiteste Definition des Begriffes der Amitose (Kernamitose) im symplasmatischen Retikulum unter Einbeziehung des Auftretens kleinster und kleiner Kernfragmente mit ganz normaler, nicht degenerativer und nicht hyperchromatisch-pyknotischer Chromatinstruktur. Es gäbe noch viel zu erörtern im Zusammenhang mit dem Beitrag Buchers, doch kann dies nicht Aufgabe eines Referates sein. Das Verdienst Buchers mit dem Beitrag, die Literatur seit dem Artikel Wassermanns neu bearbeitet zu haben, bleibt bestehen. Es liegt in der Schwierigkeit der Materie begründet, daß man am Schluß der Abhandlung „so klug als wie zuvor“ ist, was Bucher selbst feststellt, indem er betont, daß uns die Forschung der 30 Jahre seit Wassermann in den wesentlichen Fragen nicht nur nicht voran, sondern neue offene Probleme gebracht haben. Jedem, der sich mit dem Problem der Amitose beschäftigt, wird der Beitrag Buchers ebenso unentbehrlich sein wie der seinerzeitige Beitrag Wassermanns.

A. Pischinger (Wien).

Schussnig, Bruno: Handbuch der Protoptenkunde. Eine vergleichend morphologische und biologische Darstellung der niederen Pflanzen für Biologen, Mediziner und Landwirte. II. Band. Mit 890 Abb. im Text. X, 1144 S. Jena: VEB Gustav Fischer. 1960. Ganzl. DM 137.50.

Handbücher werden heute, wegen der Fülle des Stoffes, meist nicht von einer Hand geschrieben, sondern von mehreren Autoren. Das bringt den Nachteil mit sich, daß selbst bei strenger Gesamtkoordination die Einheitlichkeit der übergeordneten Idee und der Darstellung nicht vollkommen erreicht werden kann. Es ist daher sehr zu begrüßen, wenn jetzt noch ein einzelner Autor den Mut und die enorme Energie hat, allein ein so großes Werk zu konzipieren und den Plan auch wirklich durchzuführen. Es ist dies aber

besonders zu begrüßen, wenn das große Werk, wie dies bei der Protistenkunde von Schussnig der Fall ist, auch tatsächlich in vorbildlicher Vollkommenheit gelungen ist. Der II. Band des Handbuchs liegt nun vor und all das Lob, das dem I. Band (1953) gespendet worden ist, gilt auch für den zweiten. Das bewundernswert umfassende brillante Wissen, das offenbar stets parat ist, ermöglicht dem Autor die Verknüpfung von morphologischen, physiologischen und biologischen Tatsachen, die aus der Überfülle der Literatur sich anbietet, zu einem belebten einheitlichen Bild der Protophyten, wie es noch niemand so vollendet gezeichnet hat. Es werden behandelt das Kinetom, Chondriom, Plastidom, Vacuum, die alloplasmatischen Bestandteile, die Hüllbildungen, Morphogenese der Zelle, ungeschlechtliche Fortpflanzung, vegetative Vermehrung, geschlechtliche Fortpflanzung. Der überwältigende Reichtum an Formen und Vorgängen ließ sich nur durch einen Reichtum auch der Nomenklatur präzise fassen und ordnen. Es wurde so mancher neue Terminus geprägt, an den man sich erst gewöhnen wird müssen. Erstklassig und staunenswert ist die Fülle und Vollkommenheit der Abbildungen, von denen man keine entbehren möchte, ebensowenig wie auch nur eine Seite des Textes.

F. Weber (Graz).

Troll, Wilhelm: Allgemeine Botanik. Ein Lehrbuch auf vergleichend-biologischer Grundlage. 3. Aufl. Mit 699 Abb., XVI, 927 S. Stuttgart: F. Enke. 1959. DM 73.—, Ganzl. DM 77.—.

Das großangelegte und ausführliche Lehrbuch der allgemeinen Botanik von Troll liegt nunmehr in neuer Auflage vor. Sein Aufbau ist gegenüber der ersten Auflage unverändert geblieben. Der Grundgedanke ist die Synthese von Form und Lebenserscheinungen der Pflanze. Folgerichtig geht es nicht wie die meisten Lehrbücher von der Zelle aus, sondern vom Vergleich der Grundfunktionen von Tier und Pflanze und von der äußeren Form der Pflanze. Die vergleichende Darstellung, die auch alle übrigen Kapitel — Cytologie, Anatomie, Physiologie und Fortpflanzung — durchzieht, ermöglicht es, die einzelnen Fakten stets in Beziehung zum Ganzen zu setzen, ein besonderes Anliegen des Verfassers. Freilich sind dadurch manche Abschnitte an ungewöhnlicher Stelle zu finden; die Osmose wird bereits bei der Cytologie abgehandelt, die Glykolyse ist von der Dissimilation räumlich weit getrennt. — Der Text ist überall den inzwischen erzielten Fortschritten angepaßt worden, die Seitenzahl ist gegenüber der ersten Auflage um 178, die der Abbildungen um fast 100 vermehrt. Hier interessiert insbesondere die Erweiterung des Kapitels Cytologie. Ausführlich sind der Chemismus und die Eigenschaften der Polypeptide (inkl. der Ringpeptide) behandelt; es fällt jedoch auf, daß z. B. die von Frey-Wyssling selbst modifizierte Haftpunkttheorie oder die Cytonemata ohne jeden Vorbehalt als offenbar gesicherte Tatsache angeführt werden, während die Chromomen nur vermutlich Sitz der Erbanlagen seien. Dagegen erscheint das Watson-Crick-Modell heute wohl soweit gesichert, daß seine Aufnahme in ein größeres Lehrbuch gerechtfertigt erschiene, sie wäre auch der etwas knapp geratenen Behandlung der Viren zugute gekommen. Neu sind die Abschnitte über Chondriosomen und Mikrosomen; in den Abschnitt Zellwand sind die neuen Ergebnisse über ihren Feinbau und die Lignifizierung eingearbeitet. In der Stoffwechselphysiologie sind besonders die Abschnitte über den Chemismus stark angewachsen. Bei der Nährstoffaufnahme ist bereits die Chelatbildung berücksichtigt; auf die Chemie der Assimilation der Glykolyse und der Atmung ist soweit eingegangen, daß auf dieser Grundlage das Verständnis der aktuellen Literatur möglich wird. Ähnliches gilt für die Entwicklungsphysiologie; erstaunlich ist allerdings, daß in einem Lehrbuch, das besonderen Wert auf morpho-

logische Grundlegung und Symmetriellehre legt, nichts über Meristemoide und Musterbildung zu lesen ist. Entsprechend der vergleichend-biologischen Grundhaltung des Buches hätte man die Behandlung der Spaltöffnungen auch unter den Turgorbewegungen (und vielleicht etwas ausführlicher) gewünscht.

Doch sind dies alles Punkte, die vielleicht einer subjektiven Einstellung des Referenten entspringen, sie sollen den Wert des Gesamtwerkes in keiner Weise schmälern. Die umfassende und gleichmäßige Behandlung des großen Stoffgebietes durch einen einzigen Autor verdient unsere volle und uneingeschränkte Bewunderung. Vielleicht ist für den Anfänger die Ausführlichkeit etwas verwirrend, er wird zunächst Wesentliches und weniger Wichtiges schwer auseinanderhalten können, doch wird er dadurch von allem Anfang an von gewohnten Denkgeleisen ferngehalten. Besonders zu begrüßen ist die breite vergleichende Grundlegung, die einer vorzeitigen Spezialisierung entgegenwirkt. Nicht nur der vorgeschrittene Studierende, auch der Fachmann wird dieses Lehrbuch mit wirklichem Gewinn studieren.

O. Härtel (Graz).

Zytologija. Herausgegeben von der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau-Leningrad. Tom. 1, H. 4—6. Moskau-Leningrad. 1959. Heftpreis 12 Rubel.

Die Akademie der Wissenschaften der UdSSR legt weitere 3 Hefte (Juli—Dezember 1959) der neuen Zeitschrift „Zytologija“ vor. Die darin enthaltenen Arbeiten umspannen ein ähnlich weites Stoffgebiet, wie dies bereits im ersten Referat (vgl. Protoplasma LI/4, 639) angedeutet wurde.

Von Aufsätzen, die allgemeine Probleme behandeln, seien hervorgehoben: Darwinismus und Zytologie (Poljanskij), Ursprung der Vielzelligkeit des tierischen Organismus (Hlopjina), Mitose und Amitose in der Onto- und Phylogenie (Korre), Zellphysiologie und Artproblem in der Zoologie (Ushakov). Die übrigen Arbeiten lassen sich zu folgenden Stoffgebieten gruppieren (aus Raumgründen wird auf die Nennung der Autoren verzichtet): Feinstruktur (Proteinstruktur in Nerven, Chloroplastenmembran), biochemische Fragen (Vitamin B₁₂, RNS-Pyronin-Komplexe sowie RNS und Anticholinesterase in Nerven, P im Protoplasma), Nerven- und Muskelphysiologie (Polarisation der Muskel, RNS in Nerven), Resistenzschwankungen (Temperaturresistenz bei Paramaecien, parasitische Protozoen, Froschspermatozoen und -muskel, Strahlenresistenz und -wirkungen bei Hefezellen, Nerven, Chromosomenreparation, je eine Arbeit mit der Strahlenstichmethode und über Strahlenantagonismus) und Zellkern (Größe und Einwirkung von Narkotika, Zytochemie bei der Teilung von Protisten, Geschlechtschromatin). Von Interesse dürfte eine Differentialfärbung (Azur-Neutralrot) zur Unterscheidung gesunden und geschädigten Gewebes sein (Frosch-Cornea). Ein biographischer Aufsatz behandelt Nassonows Werk. Abschließend seien Berichte über in- und ausländische Kongresse erwähnt; kritische Buchbesprechungen sind in diesen drei Heften nicht enthalten.

O. Härtel (Graz).

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Neufahrt, A.: Untersuchungen über die Wirkungen von UV- und Röntgenstrahlen auf die Mitose des Eies von <i>Parascaris equorum</i> (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms	2. 10. 1959
Sauer, H.: Über die Einwirkung von kurzwelligem Licht auf die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, Pyronin und Janusgrün B	14. 12. 1959
Enöckl, F.: Über den Zustand des Plasmas in vakuolenkontrahierenden <i>Anchusa</i> -Zellen	18. 1. 1960
Rossner, W.: Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluß von Streptomycin auf <i>Sinapis alba</i> L.	8. 2. 1960
Mitrakos, K.: Feinbau und Teilung bei Plastiden einiger Florideen-Arten	10. 2. 1960
Pfeiffer, H. H.: Bericht über das Treffen der Biorheologen in Oxford (England)	11. 2. 1960
Ziegler, Annemarie: Plastiden- und Stärke-Fluorochromierung mit Uranin	15. 2. 1960
Fetzmann, Elsalore: Beobachtungen an Inhaltskörpern von <i>Callithamnion granulatum</i>	19. 2. 1960
Klinzel, H.: Neuere Erkenntnisse über Energiewechsel und Makromolekülsynthese der Zelle	27. 2. 1960
Ryczkowski, M.: Observations on the Osmotic Value of the Sap of the Central Vacuoles of Ovules	3. 3. 1960
Ryczkowski, M.: Viscosity of Central Vacuole Sap of Ovula	3. 3. 1960
Burlan, K.: Über Chloroplastenkontraktion bei <i>Closterium lunula</i> und deren Reversibilität	4. 3. 1960
Wehrmeyer, W.: Untersuchungen zur Spaltöffnungs-doppelbildung	11. 3. 1960
Jarosch, R.: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper (I. Lichtmikroskopischer Befund)	8. 3. 1960
Zurzycki, J., und W. Starzecki: Photosynthesis of <i>Helodea canadensis</i> after Vital Staining with Rhodamine B	18. 3. 1960
Nakazawa, S.: Dynamics of Morphogenetic Fields	22. 3. 1960
Käppner, W.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe <i>Chaos chaos</i> L.	26. 3. 1960
Thaler, Irmtraud: Virus-Eiweißkristalle in <i>Phajus grandifolius</i>	26. 3. 1960
Kiermayer, O.: Elektive Vitalfärbung der Sekretidioblasten von <i>Helianthus annuus</i>	31. 3. 1960
Lamprecht, Ingrid: Die Feinstruktur der Plastiden von <i>Tradescantia albiflora</i> (Kth.) bei Eisenmangelchlorose (I. Lichtmikroskopische Untersuchungen)	8. 4. 1960
Lamprecht, Ingrid: Die Feinstruktur der Plastiden von <i>Tradescantia albiflora</i> (Kth.) bei Eisenmangelchlorose (II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen)	8. 4. 1960
Thaler, Irmtraud: Virus-Einschlüsse in <i>Fritillaria meleagris</i> L.	24. 4. 1960
Biebl, R., W. Uri und Gertrude Janeček: Untersuchungen über chemischen Strahlenschutz an Pflanzenzellen	3. 5. 1960
Pavletić, Z., und H. Lieth: Die Entwicklung von Lophocolea-Arten nach einer kurzzeitigen Plasmolysebehandlung	28. 4. 1960
Kelbitsch, Helga: Crown gall an viruskranken Pflanzen	6. 5. 1960
Moldenhauer Brooks, Matilda: Nicotine as a Redox-reducing Reagent Producing Abnormal Growth in Animal Cells	12. 5. 1960
Horie, K.: The Behavior of the Petals in the Fading of the Flowers of <i>Tradescantia reflexa</i>	14. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste	23. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: L'effet du β -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste	28. 5. 1960
Straus, W.: Studies on Chromoplasts of Carrot.	10. 6. 1960

Fortsetzung auf der IV. Umschlagseite

Fortsetzung von der III: Umschlagseite

Oppenheimer, H. R., und B. Jacoby: Usefulness of Autofluorescence Tests as Criterion of Life in Plant Tissues	17. 6. 1960
Arndt, E. A.: Professor Dr. Josef Spek 65 Jahre alt	24. 6. 1960
Tazawa, M.: Weitere Untersuchungen zur Osmoregulation der <i>Nitella</i> -Zelle	28. 6. 1960
Reiter, L.: Viruskristalle in Nelken	7. 7. 1960
Ziegler, Annemarie: Spindelförmige Inhaltkörper in den Zellen von <i>Nitophyllum</i>	9. 7. 1960
Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien VII. Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel	12. 7. 1960
Käppner, W.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe <i>Chaos chaos</i> L. (II. Die Wirkung von Salyrgan, Cystein und ATP) . . .	14. 7. 1960
Kinzel, H., und R. Imb.: Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung in vivo	15. 7. 1960
Kenda, Griseldis: Einschlusskörper in den Epidermiszellen von <i>Chlorophyllum comosum</i>	20. 7. 1960
Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (I. Die Frühwirkungen von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i>)	20. 8. 1960
Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (II. Die Spätwirkung von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i>)	20. 8. 1960
Sitte, P.: Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden	28. 8. 1960

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Unter Mitwirkung von F. M. Burnet, Melbourne, M. D. Eaton, Boston, W. Henle, Philadelphia, C. W. Jungeblut, New York, P. Lépine, Paris, F. O. MacCallum London, H. Ruska, Düsseldorf, R. N. Shope, New York, K. M. Smith, Cambridge, W. M. Stanley, Berkeley, J. D. Verlinde, Leiden

Herausgegeben von S. Gard, Stockholm, C. Hallauer, Bern, K. F. Meyer, San Francisco, E. G. Nauck, Hamburg, A. B. Sabin, Cincinnati

Schriftleitung: C. Hallauer, Bern

Zuletzt erschien:

Band X, Heft 2. (Abgeschlossen im Juli 1960.) Mit 47 Textabbildungen. 137 Seiten. 1960
S 210.—, DM 35.—, sfr. 35.80, \$ 8.35

Inhaltsverzeichnis: Ruska, H. Gustav-Adolf Kausche zum Gedächtnis. — Prinzie, A., E. Schonne et P. De Somer. Inactivation et spécificité cellulaire de l'acide ribonucléique du poliovirus. — Gibbels, Ellen, W. Scheid und R. Ackermann. Über die diaplazentäre Übertragung neutralisierender Antikörper gegen die Poliomyelitoviren. — Ackermann, R. Über die Züchtung des Virus der lymphocytären Choriomeningitis in Mäuseembryo-Zellkulturen. — Maass, G., und K. Mannweiler. Cytologische und biologische Untersuchungen über das Verhalten des Mumps-Virus in Affeniereneithelkulturen. — Siegel, B. V., and S. W. French. Histologic Study of Chick Embryos for Death Causation Following Chorioallantoic Inoculation with Canary Pox Virus. — Wigand, R., und G. Nielsen. Zur Frage der Existenz löslicher und virusgebundener Anteile von komplementbindendem Antigen und Hämagglutinin des Vaccinevirus. — Mayr, A., und A. Herrlich. Züchtung des Variolavirus in der infantilen Maus. — Bonitz, K., und K. Seelemann. Pockenimpfstoff aus Gewebekulturen. — Weissenberg, R. Some Remarkable Osmiophilic Structures of the Inclusion Bodies in the Lymphocystis Virus Disease of the European Flounder. — Hallauer, C., und G. Kronauer. Nachweis von Gelbfebervirus-Hämagglutinin in menschlichen Explantaten.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

